

明 細 書

シノビオリン遺伝子のプロモーター

5 技術分野

本発明は、シノビオリン遺伝子のプロモーターに関する。

背景技術

シノビオリン(Synoviolin)は、関節リウマチ患者の滑膜細胞ライブラリーから、
10 抗滑膜細胞抗体を用いた免疫スクリーニングによりクローニングされたタンパク質である。

シノビオリンは、RING フィンガードメインを有するユビキチンリガーゼ(E3)であり、小胞体における品質管理を担う機能を有する。そして、シノビオリン(シノビオリン遺伝子)のアミノ酸配列(塩基配列)は、酵母 Hrd1 と高い相同性を有し、酵母 Hrd1 のヒトホモログとしてクローニングしたヒト hrd1 と同じ分子であることが判明した(Kaneko, FEBS Lett. Dec 4;532(1-2):147-52,2002)。

上記小胞体の品質管理を担うために、現在までに以下の3つの機構が知られている。1つは、PERK(小胞体係留蛋白質)による機構である。この機構は、翻訳開始因子である eIF をリン酸化することにより、翻訳を抑制し、ER ストレス(後述)を軽減するというものである。2つ目は、ATF6、IRE-1 等の ER ストレスを感知する小胞体膜タンパクによる ATF6、XBP1 の転写因子を介した転写調節機構である。この機構によれば、ATF6、XBP1 は、Bip 等のシャペロン分子の転写を誘導し、不良タンパク質の再折りたたみ反応を促進する。この反応は、UPR(unfolded protein response)と呼ばれている。3つ目は、不良タンパク質を分解し、
25 ER ストレスを軽減させる ERAD(endoplasmic reticulum-associated degradation)である(Kaufman RJ, Nat Rev Mol Cell Biol Jun;3(6):411-21,2002)。この ERAD について詳述すると以下の通りである。

すなわち、タンパク質は、細胞質で合成された後、正しい立体構造を形成して所定の場所に運ばれて初めて機能することができる。適切な高次構造がとれなかった不良又は損傷タンパク質は、細胞のもつ品質管理機能によりチェックを受け
30

BEST AVAILABLE COPY

て、再生又は分解されて、細胞機能の恒常性を保つ。

小胞体内腔における生合成途中のタンパク質は不安定であるため、種々の物理化学的ストレス（例えば虚血、低酸素、熱ショック、アミノ酸飢餓、遺伝子変異等）に曝される。このようなストレスを小胞体ストレス（ER ストレス）と呼び、

5 小胞体内に異常な折りたたみ構造を持つタンパク質(unfolded protein)の出現頻度を上昇させる。立体構造に異常を来した不良タンパク質は小胞体を出てゴルジ体に輸送されないため、そのままでは小胞体内に不良タンパク質が蓄積されてしまう。そこで、これらの ER ストレスに対して、細胞は UPR 及び ERAD と呼ばれる小胞体特異的なストレス応答機構によって、不良タンパク質を分解し、そのよう
10 うな不良タンパク質が蓄積することによる小胞体のストレスを防ぐのである。シノビオリンは、この 3 つ目の機構である ERAD に関与し、ER ストレスにより誘導される（Kaneko FEBS Lett. Dec 4;532(1-2):147-52,2002）。

一方、本発明者は、シノビオリンの発現増加が、ERAD を亢進させることにより、ER ストレスによるアポトーシスの感受性を低下させ、その発現低下により
15 アポトーシスの感受性が増加することを証明した。

また、リウマチ滑膜細胞において、正常滑膜に比較しその発現が増加していることも確認している。そこで、関節炎におけるシノビオリンの意義を確かめるため、ヘテロノックアウトマウスに CIA（collagen induced arthritis; コラーゲン誘導関節炎。ウシ II 型コラーゲンを皮内注射し、免疫させ、産生された抗体にて関節
20 炎を発症させるマウスモデル）を誘導した。その結果、シノビオリンの発現を半分にすることで ER ストレスに対するアポトーシス感受性が野生型マウスに比べ減少し、CIA に抵抗性をもつことを証明した。このことから、その発現の要求性には、細胞、組織特異性があることが考えられた。

以上の知見より、シノビオリンの量の調節機構は、細胞の ER ストレスに対するアポトーシス感受性を担っていることから、その機構の解明は大変重要である。
25

発明の開示

本発明は、シノビオリン遺伝子のプロモーターを提供することを目的とする。

本発明者は、上記課題を解決するため鋭意研究を行った結果、シノビオリンの
30 プロモーター領域を切断して種々の長さを有する断片についてプロモーター活性

を調べた結果、そのコア領域を特定し、転写因子との相互作用を解明することに成功し、本発明を完成するに至った。

すなわち、本発明は以下の通りである。

- 5 (1) 配列番号 1 又は 2 に示す塩基配列のうち少なくとも 2120～2130 番目の塩基配列を含む、シノビオリン遺伝子のプロモーター。
- (2) 配列番号 1 又は 2 に示す塩基配列のうち少なくとも 1～2201 番目、969～2201 番目、1142～2201 番目、1699～2201 番目、1880～2201 番目、2002～2201 番目、2094～2201 番目及び 2118～2201 番目の領域の塩基配列からなる群から選ばれるいずれかの塩基配列を含む、シノビオリン遺伝子のプロモーター。
- 10 (3) 配列番号 1 に示す塩基配列のうち少なくとも 1～3043 番目、969～3043 番目、1142～3043 番目、1699～3043 番目、1880～3043 番目、2002～3043 番目、2094～3043 番目及び 2118～3043 番目の領域の塩基配列からなる群から選ばれるいずれかの塩基配列を含む、シノビオリン遺伝子のプロモーター。
- (4) 配列番号 2 に示す塩基配列のうち少なくとも 1～3092 番目、969～3092 番目、15 1142～3092 番目、1699～3092 番目、1880～3092 番目、2002～3092 番目、2094～3092 番目及び 2118～3092 番目の領域の塩基配列からなる群から選ばれるいずれかの塩基配列を含む、シノビオリン遺伝子のプロモーター。
- (5) 以下の(a)又は(b)のプロモーター。
 - (a) 上記(1)～(4)のいずれか 1 項に記載のプロモーターの塩基配列の一部の領域
20 に欠失、置換若しくは挿入が生じ、かつプロモーター活性を有する塩基配列を含む、シノビオリン遺伝子のプロモーター
 - (b) 上記(1)～(4)のいずれか 1 項に記載のプロモーターの塩基配列に相補的な配列とストリンジントな条件下でハイブリダイズし、かつ、プロモーター活性を有する塩基配列を含む、シノビオリン遺伝子のプロモーター
- 25 (6) 上記(1)～(5)のいずれか 1 項に記載のプロモーター、発現の目的遺伝子及びターミネーターを含む遺伝子発現カセット。
- (7) 上記(6)記載の遺伝子発現カセットを含む組換え発現ベクター。
- (8) 上記(7)記載の組換え発現ベクターを含む形質転換体。
- (9) 上記(1)～(5)のいずれか 1 項に記載のプロモーターの活性を阻害又は促進する
30 ることを特徴とする、転写活性調節方法。

上記プロモーターの活性の阻害又は促進は、転写因子の結合活性を阻害又は促進するものである。また、転写因子の結合部位としては Ets 結合部位が挙げられる。転写因子としては、例えば GABP α 、GABP β 、GABP α と GABP β との複合体、Ets1、Pea3、Tel 及び Fli-1 からなる群から選ばれるいずれかのものを例示することができる。

図面の簡単な説明

- 図 1 a は、切断型シノビオリンプロモーターの活性を示す。
図 1 b は、切断型シノビオリンプロモーターの活性を示す。
10 図 1 c は、シノビオリンプロモーターの Ets 結合部位及びコア領域を示す。
図 1 d は、プロモーターに変異を導入したときの転写活性を示す。
図 2 a は、ゲルシフトアッセイを行なった結果を示す写真である。
図 2 b は、ゲルシフトアッセイを行なった結果を示す写真である。
図 2 c は、ゲルシフトアッセイを行なった結果を示す写真である。
15 図 2 d は、ゲルシフトアッセイを行なった結果を示す写真である。
図 3 a は、シノビオリンプロモーターの転写活性を示す。
図 3 b は、シノビオリンプロモーターの転写活性を示す。
図 3 c は、RNAi を利用してノックアウトした NIH3T3 細胞におけるシノビオリンプロモーターの転写活性を示す。
20 図 4 a は、3k と 1k のシノビオリンプロモーターに LacZ を結合したプラスミドの構築図である。
図 4 b は、マウス胚におけるシノビオリンプロモーターの発現を示す写真である。
図 4 c は、マウス胚におけるシノビオリンプロモーターの発現を示す写真である。
25 図 5 は、RA 滑膜細胞におけるシノビオリンプロモーターの発現を示す写真である。
図 6 a は、RNAi を利用してシノビオリンをノックダウンした NIH3T3 細胞におけるアポトーシスを示す写真及びウエスタンブロッティングの結果を示す図である。
30

図 6 b は、デコイ ODN を利用してシノビオリンをノックダウンした NIH3T3 細胞におけるアポトーシスを示す写真及びウエスタンブロッティングの結果を示す図である。

図 7 a は、シノビオリンが過剰発現された細胞を示す写真である。

5 図 7 b は、EBS デコイ ODNs によるシノビオリンの発現抑制を示す写真である。

図 7 c は、シノビオリンを過剰発現した NIH3T3 細胞における EBS デコイ ODNs 処理によるアポトーシスを示す写真である。

図 7 d は、シノビオリンを過剰発現した NIH3T3 細胞における EBS デコイ ODNs 処理によるアポトーシスを示す図である。

10

発明を実施するための最良の形態

以下、本発明を詳細に説明する。

1. 概要

本発明者は、シノビオリンを中心としたリウマチ病態解析を現在行なっている。

15 最近、シノビオリンノックアウトマウスを用いた解析において、ER ストレスによるアポトーシス誘導の域値に ERAD の機能を担うシノビオリンの量が関与していることを見出した。

そこで、アポトーシス誘導の感受性を決定するシノビオリンの量を調節する転写機構を解明するためにプロモーター解析を行った。

20 現在、シノビオリンの誘導的遺伝子発現を担う機構として、ER ストレスを感じしリン酸化された IRE-1 を介しスプライシングされた XBP-1 による転写制御が考えられている。この制御機構は以下の通りである。すなわち、ER に不良タンパク質が蓄積すると、ER に局在する膜タンパク質である IRE-1 は二量体化し、分子間自己リン酸化が起こる。その結果、IRE-1 内のエンドヌクレアーゼ様ドメインが活性化して XBP-1 の未成熟 mRNA をスプライシングし、成熟型 XBP-1 を作製する。この XBP-1 が ER 分子シャペロン遺伝子などの転写を促すと考えられる。

しかし、構成的遺伝子発現に関しての報告はない。そこで、まず、はじめに、マウス細胞株及びマウス胚を用いてその構成的遺伝子発現を担う部位を決定した。

その結果、シノビオリンの構成的発現を担う EBS を同定し、そのエレメントが
30 in vivo においてシノビオリンの発現に必須であることを証明した。また、NIH3T3

細胞において、その EBS を介し Ets ファミリーの一つ GABP α/β 複合体がその転写制御に関与していることを示した。

シノビオリンの発現は、ヘテロノックアウト (LacZ knock in mouse) の発現解析、ノーザン、ウエスタンによる解析によればユビキタスである。つまり、多くの細胞においてシノビオリンの発現が必要とされていることが考えられる。このことは、シノビオリン ノックアウトマウスが全身性のアポトーシス亢進にて胎生致死であることから推察される。但し、その発現には強弱があり、特に分泌能力の高い細胞（脾臓、精巣、神経細胞）においてその発現が強い。このことは、一部の細胞においては、シノビオリンの発現が非常に高く要求されていると考えられる。

シノビオリンの量を規定する転写制御を解明するため、本発明においてプロモーター解析を行った。転写制御機構には、(i)基本転写複合体を含む構成的遺伝子発現と、(ii)ある刺激に対する誘導的遺伝子発現とがある。現在まで、ER ストレスに対しシノビオリンが誘導されることは報告されているが、その構成的遺伝子発現に関しての報告はない。そこで、本発明者は、構成的遺伝子発現を担うエレメントの検索を行った。

シノビオリンのプロモーターには TATA ボックス、イニシエーター配列が存在しない。このようなプロモーター構成の場合、SP1 や Ets ファミリー等の転写因子がその転写誘導において重要である (Rudge, Exp Cell Res. Mar 10;274(1):45-55. 2002)。

Ets ファミリーは、酵母からヒトまで保存された Ets と呼ばれるドメインをもつ転写因子である。このドメインは、30 種類以上のファミリーを形成し、その多くが分化・増殖・アポトーシスを担う分子の転写活性を担っている (D.K.Watson and A.Seth,; Oncogene.review issue. Dec 18; 19(55) ; 2000)。

その Ets ファミリーの中でも GABP α と呼ばれる転写因子は、ターゲット遺伝子の転写制御においていくつかの特徴をもっている。まず、GABP α は、Ets ドメインによる DNA 結合能をもつが、転写活性化能を持たない。これに対し、GABP α のコファクターとして働く GABP β は DNA 結合能をもたず、GABP α と 2 量体を形成することにより転写活性を誘導し、ヘテロ 4 量体を形成することによりさらに高い転写活性化能を発揮する (Yu M. J Biol Chem Nov 14; 272(46): 29060-7.

1997)。また、GABP α は、TATA ボックスを持たない遺伝子や、複数の転写開始点をもつ遺伝子の発現においてイニシエーターとして働くことができる(Yu M. J Biol Chem Nov 14; 272(46): 29060-7. 1997; Kamura T. J Biol Chem Apr 25; 272(17): 11361-8. 1997)。さらに、GABP α はその発現がユビキタスであるにも関わらず、
5 他の部位に結合するパートナーの転写因子と相乗的に働くことにより、細胞特異的な分化・増殖に関与する遺伝子の発現を担う (Schaeffer L, EMBO J. Jun 1; 17(11): 3078-90. 1998)。

以上のことから、本発明者はシノビオリンの構成的遺伝子発現を担うエレメントを決定し、さらにそのエレメントによる NIH3T3 細胞における意義について検討した。
10

2. プロモーター

プロモーター領域を得るには、シノビオリン遺伝子又はマウスやヒトゲノム配列等から、制限酵素を用いて切り出すことが可能である。しかしながら、一般的
15 に都合の良い制限酵素部位が適切な位置に存在するとは限らない。そこで、予め制限酵素認識部位を設けたプライマーを用い、PCR で所望のプロモーター領域を増幅することにより得ることができる。また、既に判明しているプロモーター領域の塩基配列情報をもとにして、所望のプロモーター領域を化学合成することも可能である。

(1) プロモーター配列

20

配列番号 1 にマウスシノビオリン遺伝子の全長プロモーター配列を、配列番号 2 にヒトシノビオリン遺伝子の全長プロモーター配列を例示するが、本質的に転写活性を有する配列であればこれらの配列に限定されるものではなく、全長プロモーターを切断することが可能であり、一部の領域に欠失、挿入、置換、付加な
25 どによってその塩基配列を変異させることも可能である。但し、本発明においては、コア領域 (Ets 結合部位を含む) に変異を導入するとプロモーター活性の低下を来たすことが多いため、コア領域への変異の導入は、プロモーター活性を抑制する場合に行なうことが好ましい。

遺伝子の変異の導入は、通常の部位特異的変異誘発法を採用することができ、
30 例えば、GeneTailorTM Site-Directed Mutagenesis System (Invitrogen)、TaKaRa

Site-Directed Mutagenesis System (Mutan-K、Mutan-Super Express Km：タカラバイオ) 等を用いて行なうことができる

本発明のプロモーターにおいて、その機能の中核を担うコア領域は、配列番号 1 又は 2 に示す塩基配列のうち、転写開始点（配列番号 1 又は 2 に示す塩基配列の第 2201 番目の t）を起点としてその上流側（5'側）に向かって第 71 番目(-71)から第 81 番目(-81)までの領域、すなわち、配列番号 1 又は 2 に示す塩基配列のうち第 2120～2130 番目の領域である。

従って、配列番号 1 又は 2 に示す全長配列において、上記コア領域を含む限り、その長さ限定されるものではない。例えば、後述の表 1 及び表 2（実施例 1 参照）に示されている全長又は切断型配列であって上記コア領域を含むものも、本発明のプロモーターに含まれる。また、配列番号 1 又は 2 に示すプロモーター配列又はこれらの切断型プロモーター配列のうち、上記コア領域を含む配列に対して相補的な配列に、ストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、シノビオリンのプロモーター活性を有するものも、本発明のプロモーターに含まれる。

なお、本発明においては、プロモーター領域の位置を指定する場合、配列番号 1 又は 2 に記載の塩基番号を基準として特定する場合と、転写開始点を基準として特定する場合がある。転写開始点を基準とする場合は、配列番号 1 又は 2 に示す塩基配列の第 2201 番目のチミジン(t)を転写開始点（TS）とする。そして、TS を起点として、上流（5'側）方向は負の符号(-)をつけて特定し、下流（3'側）方向は正の符号(+)をつけて特定する。但し、5'方向は、TS の 1 塩基上流（5'側）の塩基を-1 とし、3'方向は、TS の塩基を+1 として特定する。例えば、配列番号 1 に示す塩基配列の第 1 番目のグアニン(g)は、TS からみて-2201 の位置にあり、配列番号 1 に示す塩基配列の第 3043 番目のグアニン(g)は、TS からみて+843 の位置にあるということになる。

「ストリンジェントな条件」とは、ハイブリダイゼーションにおいて洗浄時の塩濃度が 100～500 mM、好ましくは 150～300 mM であり、温度が 50～70℃、好ましくは 55～65℃の条件を意味する。また、「プロモーター活性」とは、本発明のプロモーター領域に転写因子が結合し、転写を起こさせる活性を意味する。

「ストリンジェントな条件下でハイブリダイズ」する DNA 断片には、上記ストリンジェンシー条件下において、その一部の領域の塩基配列に欠失、置換、挿

入、付加等の変異が生じていてもハイブリダイズし得るものを含む。プロモーターは、種々の長さの切断型を生じるため、ハイブリダイズし、かつプロモーター活性を有する限り上記欠失、置換、挿入、付加等の変異の数は特に限定されるものではないが、例えば1個又は数個（1個～10個程度、好ましくは1個～5個程度）の塩基に上記変異を生じたものを例示することができる。

5 (2) 組換えベクターの構築

本発明の組換えベクターは、本発明のプロモーター、発現の目的遺伝子、ターミネーターを適当なベクターに挿入することによって得ることができる。これを「遺伝子発現カセット」という。遺伝子発現カセットに使用されるベクターとして、

10 では、pBR系、pUC系、pBluescript系等の大腸菌プラスミドベクター、あるいはpcDNA3系の哺乳細胞発現用プラスミドベクターやアデノウイルス、レトロウイルス等のウイルスベクターを例示することができる。発現の目的遺伝子は、シノビオリン遺伝子に限らず、異種構造遺伝子（例えばIL-1、IL-6、TNF α 等の各種サイトカイン遺伝子、酵素遺伝子、増殖因子遺伝子、ケモカイン遺伝子等）であ

15 ってもよい。発現ベクターの構成成分をベクターに挿入することは、慣用の技術により当業者が容易に実施することができる。さらに、上記ベクターには、選択マーカー遺伝子などを含めることも可能である。選択マーカー遺伝子としては、G-418等の抗生物質耐性遺伝子、チミジンキナーゼ遺伝子、ジフテリアトキシン遺伝子等が挙げられる。

20 本発明において使用し得るターミネーターは特に限定されるものではなく、例えばpoly A signal等が挙げられる。

(3) 形質転換体

宿主へのプラスミドの導入は、宿主の形質転換に用いられている一般的な方法を採用することが可能である。すなわち、当業者に周知のプロトプラスト法、リ

25 チウム法、エレクトロポレーション法、及びそれらの変法を適用すればよい。宿主は特に限定されるものではなく、例えば大腸菌等の細菌、酵母、動物細胞、昆虫細胞等が挙げられる。

3. プロモーターの機能解析

30 (1) 転写活性の解析

プロモーターの転写活性の解析は、一般的に行なわれるルシフェラーゼアッセイ、ゲルシフトアッセイ、CAT アッセイ等を採用することができる。これらのアッセイを行なうためのキットも市販されている（例えば promega dual luciferase assay kit）。

- 5 例えばルシフェラーゼアッセイの場合は、目的遺伝子の転写開始点の上流にレポーターとしてホタルルシフェラーゼ遺伝子を連結する。また、アッセイの対象となる細胞間の導入効率を補正するために、サイトメガロウイルス（CMV） β ガラクトシダーゼ（ β -gal）遺伝子をレポーターとしてプロモーターの下流につないだベクターを細胞に同時に導入してもよい。細胞への導入は、例えばリン酸カルシウム法等を採用することができる。ベクターを導入した細胞は所定時間培養した後に回収し、凍結－融解等によって細胞を破壊した後、一定量の細胞抽出液を用いてルシフェラーゼ及び β ガラクトシダーゼ活性を測定する。

(2) EMSA

- 15 細胞の分化や活性化は遺伝子発現によって制御されており、転写レベルの遺伝子発現の調節は特に重要な役割を担っている。転写因子の多くは DNA の応答性配列（response element）に異なった様式で結合することが明らかになりつつある。この転写因子相互の複雑な関係を解析する方法の1つとして、ゲルシフトアッセイ（EMSA：electrophoretic mobility shift assay）がある。ゲルシフトアッセイとは、放射又は非放射標識されたプローブ DNA 断片と DNA 結合タンパク質とを混合し、
20 低塩濃度の未変性ゲルで電気泳動を行ない、DNA をオートラジオグラフィー等で検出する方法である。タンパク質と結合した DNA は、遊離 DNA と比較してゲル中で遅れて移動するため、特異的バンドとして検出することができる。DNA-タンパク質複合体に特異的抗体を作用させると、その移動度はさらに小さくなる（これをスーパーシフトという）。多くの転写因子は、この方法で同定することができる。
25 る。

- ところで、細胞において、分泌タンパク質、膜タンパクなどの小胞体を経て合成されるタンパク質の一部は、小胞体の中で不良タンパク質となっており、その不良タンパク質の分解のため、細胞に必要な機構である ERAD を担う分子の発現が必要である。このことは、後述の実施例に示すように、シノビオリンのノック
30 アウトが胎生致死であることから明らかである。すなわち、シノビオリンは細胞

に必要最低限の発現が必要であると考えられる。この転写制御に必要な部位が EBS (Ets binding site) である。この EBS 部位を介したシグナルの異常は、細胞機能の維持にとって抑制的に働く。これに対し、Ets ファミリーは種類や発現が多様であり、部位への結合能が他のパートナーと相乗的に働く。これらのことは、

5 EBS 部位を介して種々の Ets ファミリーの転写制御機構を備わっていることを意味する。

従って、EBS 部位に結合するタンパク質の作用を促進又は阻害することにより、本発明のプロモーターの転写活性機能を調節することができる。

転写因子としては、GABP α 、GABP β 、GABP α と GABP β との複合体、Ets1、

10 Pea3、Tel、Fli-1 などが挙げられる。

GABP α は、Ets ドメインをもつ Ets ファミリーの一つであり、454 アミノ酸を有するタンパク質である。GABP α は、細胞においてユビキタスに発現する。Ets ドメインを介し、GABP β とヘテロ 2 量体を形成する。さらに、2つの Ets 結合部位を使用し、ヘテロ 4 量体を形成することが知られている。

15 GABP β は GABP α のコファクターであり、382 アミノ酸を有する。Ets ファミリーではない。Ankyrin リピート配列を介し GABP α とヘテロ 2 量体を形成する。また、転写活性 ドメインをもつ。

Ets1 は、1983 年に鶏に赤芽球症を起こすレトロウイルス E26 の癌原遺伝子として発見された v-ets のヒトホモログであり、441 アミノ酸を有するタンパク質である。

20

Tel は、452 アミノ酸を有するタンパク質であり、Ets ファミリーの中でも、転写抑制に働くことが報告されている。臨床的には、t (12;21) の染色体転座により AML 1 と癒合遺伝子を形成し、白血病を起こすことが知られている。

Fli-1 は、t (11;22) 染色体転座により EWS と癒合遺伝子を形成し、ユーイング肉腫を起こすことが知られている。452 アミノ酸を有する。

25

以下、実施例により本発明をさらに具体的に説明する。但し、本発明はこれら実施例に限定されるものではない。

〔実施例 1〕 シノビオリンプロモーターの作製

30 (1) プラスミド構築

マウス (C57BL/6 系) のゲノムより、シノビオリン遺伝子を含む 5' から 3' まで約 7.5 k bp のゲノムを SyB/pBluescript にサブクローニングした。その後、シノビオリン遺伝子のプロモーター領域を XhoI と NcoI で処理し、約 3k の断片を抜き出し、PGV-B2 (TOYO INK GROUP)の中に挿入した (SyG-2.2k)。この約 3k の断片を全長プロモーターとした (配列番号 1)。さらに、全長プロモーターの 5' 側から一部の領域を削除し、プロモーター領域を短くしたコンストラクトを作製した。作製したプロモーターをまとめると表 1 の通りである。

表 1 作製したプロモーター一覧表 (マウス)

名 称	領 域*	配列番号 1 に示す塩基配列の領域
-2201/+843 (全長)	TS(転写開始点)を起点(+1)として上流(5'側)に 2201 塩基、下流(3'側)に 843 塩基の領域	1~3043
-1233/+843	TS を起点として上流に 1233 塩基、下流に 843 塩基の領域	969~3043
-1060/+843	TS を起点として上流に 1060 塩基、下流に 843 塩基の領域	1142~3043
-503/+843	TS を起点として上流に 503 塩基、下流に 843 塩基の領域	1699~3043
-322/+843	TS を起点として上流に 322 塩基、下流に 843 塩基の領域	1880~3043
-200/+843	TS を起点として上流に 200 塩基、下流に 843 塩基の領域	2002~3043
-108/+843	TS を起点として上流に 108 塩基、下流に 843 塩基の領域	2094~3043
-84/+843	TS を起点として上流に 84 塩基、下流に 843 塩基の領域	2118~3043
-73/+843	TS を起点として上流に 73 塩基、下流に 843 塩基の領域	2129~3043
-65/+843	TS を起点として上流に 65 塩基、下流に 843 塩基の領域	2137~3043
-39/+843	TS を起点として上流に 39 塩基、下流に 843 塩基の領域	2163~3043
-10/+843	TS を起点として上流に 10 塩基、下流に 843 塩基の領域	2191~3043

10 * 領域は、上流(5'側)に向かうときは TS (配列番号 1 の第 2201 番の t) の 1 個 5'側の塩基を -1 として数え、下流(3'側)に向かうときは TS を +1 として数える。

なお、ヒトのシノビオリン遺伝子の切断型プロモーターも、マウスの場合と同様に作成することができる。この場合の切断部位の位置を表 2 に示す。

表 2 作製したプロモーター一覧表 (ヒト)

名 称	領 域*	配列番号 2 に示す塩基配列の領域
-2201/+892 (全長)	TS(転写開始点)を起点(+1)として上流(5'側)に 2201 塩基、下流(3'側)に 892 塩基の領域	1~3092
-1233/+892	TS を起点として上流に 1233 塩基、下流に 892 塩基の領域	969~3092
-1060/+892	TS を起点として上流に 1060 塩基、下流に 892 塩基の領域	1142~3092
-503/+892	TS を起点として上流に 503 塩基、下流に 892 塩基の領域	1699~3092
-322/+892	TS を起点として上流に 322 塩基、下流に 892 塩基の領域	1880~3092
-200/+892	TS を起点として上流に 200 塩基、下流に 892 塩基の領域	2002~3092
-108/+892	TS を起点として上流に 108 塩基、下流に 892 塩基の領域	2094~3092
-84/+892	TS を起点として上流に 84 塩基、下流に 892 塩基の領域	2118~3092
-73/+892	TS を起点として上流に 73 塩基、下流に 892 塩基の領域	2129~3092
-65/+892	TS を起点として上流に 65 塩基、下流に 892 塩基の領域	2137~3092
-39/+892	TS を起点として上流に 39 塩基、下流に 892 塩基の領域	2163~3092
-10/+892	TS を起点として上流に 10 塩基、下流に 892 塩基の領域	2191~3092

- 5 * 領域は、上流(5'側)に向かうときは TS (配列番号 1 の第 2201 番の t) の 1 個 5'側の塩基を -1 として数え、下流(3'側)に向かうときは TS を +1 として数える。

次に上記マウス由来プロモーターの変異体を作製するため、オーバーラップ伸長による部位特異的変異誘発法(Molecular cloning, CSHL Press, 3edition, 2001 年, chapter 13) を用いて SyG-2.2kG-76T/BV2 を作製した。使用した Primer を以下に示す。

10

1. EBSm(G-76T): GCGCCGCGCGTAAGTGAGGT (配列番号 3)
2. AMLm(G-68T): AAGTGAGTTGTCTTACCCCC (配列番号 4)
3. SP1m(G-92A,C-91A): ACTCCGCCAAGCCCCGCGCC (配列番号 5)

PCR は、反応液 50 μ l 中、1 pmol SyB/pBluescript、100 pmol プライマー、0.2 mM dNTPs、5 U ポリメラーゼ、10 mM Tris-HCl (pH8.3) 及び 50 mM KCl を含む反応組成液を用いて、以下の PCR 条件で行なった。

PCR 条件

第一段階：94℃、1 分→(94℃、30 秒→55℃、30 秒→72℃、1 分) x 25 回

第二段階：1 サイクル目：94℃、1 分→55℃、30 秒→29 分かけて 30℃に落とす→30℃、1 分→9 分かけて 72℃に→72℃、1 分→(94℃、30 秒→55℃、30 秒→72℃、1 分) x 25 回

EBSm(G-76T) は、配列番号 1 に示す塩基配列の第 2125 番目 (TS から上流に向かって 76 番目(-76)) の G を T に変異させるためのプライマーであり、
 15 AMLm(G-68T) は、配列番号 1 に示す塩基配列の第 2133 番目 (TS から上流に向かって 68 番目(-68)) の G を T に変異させるためのプライマーであり、
 SP1m(G-92A) は、配列番号 1 に示す塩基配列の第 2111 番目 (TS から上流に向かって 92 番目(-92)) の G を A に変異させるためのプライマーであり、
 SP1m(G-92A,C-91A)は、配列番号 1 に示す塩基配列の第 2112 番目 (TS から-91 番
 20 目) の C を A に、かつ、配列番号 1 に示す塩基配列の第 2111 番目 (TS から-92 番目) の G を A に変異させるためのプライマーである。

〔実施例 2〕 シノビオリンプロモーターの機能解析

シノビオリンの量の調節機構を解明するために、プロモーター解析を行った。

25 なお、シノビオリンは、トランスジェニックマウス (LacZ knock in) の解析、並びにノーザン及びウエスタンの結果よりユビキタスに発現していることがわかっている。

はじめに、シノビオリン プロモーターのクローニング後、翻訳開始点より 2.2k を含む領域をルシフェラーゼベクターに結合させた。様々な細胞 (下記) を用いて、上流側から削ったコンストラクションにてその転写活性を調べた。なお、細
 30

胞は、10% 不活化ウシ胎児血清添加 DMEM 培地(Life Technologies, Inc.)を用いて培養した。

使用した細胞

ATDC5：マウス teratocarcinoma 細胞 AT805 由来の亜株。軟骨および色素細胞

5 特異的。アルカリフォスファターゼ陽性。

HEK293：ヒト胎児腎臓由来細胞

NIH3T3：マウス胎仔由来線維芽細胞

トランスフェクションとレポーターアッセイは以下の通り行なった。

細胞を 2×10^4 /well にて 24well プレートに準備した。その 24 時間後、FUGENE
10 6 キットを使用し、キットのマニュアルに従ってトランスフェクションした
(Biochem.Roche)。またトランスフェクション効率の補正のため、CMV- β -gal
を各 50ng 使用し、さらに全ベクターのみを入れて全量を 150ng にそろえた。

トランスフェクション後 30 時間でタンパク質を回収した。まず、培地を捨てた
後、PBS で洗い、Passive 溶解バッファー (Promega) を 100 μ l 用いて細胞溶解物
15 を回収した。次にその細胞溶解物の 20 μ l を 96well プレートに移した後、ルミノ
メーターにてルシフェラーゼ活性を測定した。さらに、 β -gal 活性をプレートリ
ーダーにて測定した後、 β -gal 値で Luc 値を割り補正した。なお、 β -gal 染色は
以下の通り行なった。 β -ガラクトシダーゼ は X-gal を用い、染色した (5-ブromo
-4-クロロ-3-インドリル- β -D-ガラクトピラノシド;Sigma)。胚を 4% パラホルム
20 アルデヒドで 20 分間固定し、X-gal 溶液に浸した後、37°C で 12 時間～24 時間染
色した。染色後、PBS で洗浄し、再度 4% パラホルムアルデヒドで固定した。

その結果、プロモーター配列の-84 から-73bp の領域 (12 塩基) を欠失させるこ
とによりその転写活性が 10 から 30%に低下した (図 1 a、b)。

上記欠失領域を含む-114 から-1 においては、マウスとヒトで 94%の相同性をも
25 ち、さらに 12 塩基においては、100%の相同性を認めた。コンピュータを用いた
バイオインフォマティクス解析ソフト(<http://www.cbrc.jp/research/db/TFSEARCHJ.html>)にて解析を行った結果、その 12 塩基に EBS (Ets 結合部位) が存在するこ
とが判明した(図 1c)。

次に本発明者は、その領域を含む前後の領域における転写因子結合配列に変異
30 を導入し、いくつかの Cell line を用いその部位の転写に及ぼす影響について検討

した。

図 1d にみられるように EBS (GBS ともいう。図 1d は「GBS」と表示。) の点変異により、ほぼすべての Cell line にてその活性が約 9 から 40% 程度に低下した。

これらのことから、この EBS は、シノビオリンの構成的発現を担う必須のエレメントであると考えられた。

〔実施例 3〕 EBS(-85 から-70)につく転写因子の同定

Ets ファミリーは 30 種類以上のファミリーを形成し、すべて DNA 結合ドメインである Ets ドメインを持っている。またその中心配列は GGAA であり、その配列への結合にはその配列に続く配列が重要であると考えられている。

まず、その 12 塩基配列を含んだプローブを使用し、実際にその配列に転写因子が結合するかどうか検討した。この転写因子の結合試験は、ゲルシフトアッセイ (EMSA) を行った。

EMSA は以下の通り行った。

15 Probe

EBS WT; (-85 から-70): GCGCCGCCGGAAGTGA (配列番号 6)

EBS MT; (-85 から-70): GCGCCGCCGTAAGTGA (配列番号 7)

EMSA 用のプローブは、25 塩基配列のセンス鎖とアンチセンス鎖を 90℃で 10 分アニーリングさせることにより作製した。

次に、T4 ヌクレアーゼキナーゼ、バッファーおよび γ - ^{32}P を混合し、混合液を室温で 30 分反応させた。反応液を Micro Spin G-25 カラム (Amersham Pharmacia Biotech 社) に通し、採取されたカラムのフラクションを遠心にて分離し、標識したプローブを得た。放射活性は 1 μl あたり 30000cpm 以上のものを使用した。

25 10 μg のタンパク質、反応バッファーおよびプローブを混ぜ、室温で 30 分反応させた。スーパーシフトの場合は、プローブと反応させる前に 1 時間 4℃で反応させた。その反応液を非変性ゲルにて 100v、50mA で 3 時間程度泳動させた。ゲルを乾燥させた後、Fujii BAS2000 を用いオートラジオグラフィーにて解析した。

その結果、NIH3T3 の核抽出液を使用したゲルシフトにより、4 つのバンド (図 2a の a、b、c、d の位置のバンド) が形成されることが判明した。さらに cold

competition (標識していないプローブを用いた競合試験) により、そのすべてのバンドが消失し、1塩基変異を入れたプローブにおいてはその阻害が見られなかった (図 2a)。

次に、プロモーター配列にどの Ets ファミリーが結合するかを検討するため、
5 Ets1/Pea3、Ets プローブの cold competition を行ったところ、ets1/pea3 のプローブで競合阻害され、その変異によりその阻害が消失した (図 2b、5 と 6 番のレーン)。

このことは、プロモーター配列に結合する因子は、Ets1/Pea3 プローブ (Santa Cruz 社より購入) に結合する因子である Ets 1、Pea 3、GABP α 等の転写因子である可能性が考えられた。さらにさまざまな抗体を使用して、スーパーシフト試験を行ったところ、GABP α と Tel がスーパーシフトし、Fli-1 は阻害効果を示した (図 2b の 5, 6 番のレーン、図 2c の 6, 7, 8 と 10, 11, 12 番のレーン)。また、GABP α 、Fli-1、ets1 の in vitro 翻訳産物でゲルシフト試験を行ったところ、そのすべてにスーパーシフトが見られた。これらのことから、この配列には複数の Ets ファミリーが結合することが示された。

15 次に、スーパーシフトした GABP α による GABP β との複合体形成について検討を行なった。それぞれ in vitro 翻訳産物を用い、ゲルシフト試験を行ったところ、GABP α タンパク質に GABP β タンパク質を加えたレーン 7 において、新たなバンド a、b (複合体) の形成が認められた (図 2d)。さらに、GABP α 抗体を加えるとその複合体 a、b が消失しスーパーシフトした (図 2d、レーン 8、9)。また
20 GABP β 抗体を加えたところ、複合体 a の形成が阻害された (図 2d、レーン 10、11)。

これらのことから、GABP α/β は、シノビオリン プロモーターの EBS にて複合体を形成することがわかった (図 2d)。

25 [実施例 4] NIH3T3 における Ets ファミリーによる転写制御および GABP α と Fli-1、Ets1 のシノビオリン転写活性に対する効果

それぞれ EBS に結合する転写因子の細胞内でのシノビオリンの転写活性化能を評価するため、転写活性化アッセイを行った。

(1) ODN のオリゴ作製と細胞抽出液の作製

30 20 ヌクレオチド長のオリゴデオキシリボヌクレオチド (ODN) は化学合成によ

り得た。デコイ ODN はセンス及びアンチセンスオリゴヌクレオチドのアニーリングにより作製した。対数増殖期の細胞をトリプシン処理し、96-well プレート (1×10^3 個/well)に移した。24 時間後、1 ウェルあたり 20pmol の decoy(デコイ)ODN をウェルに入れ、LipofectAMINE 2000(Invitrogen, San Diego, CA)を用いてキットの
5 説明書に従って 3 日間トランスフェクションを行った。デコイ ODN を有する細胞の増殖を決定するために、Alamar Blue (Biosource International)を用いて、キットの説明書に従って細胞増殖アッセイを行った。

(2) RNAi のオリゴ作製と細胞抽出液の作製

21 ヌクレオチド長の RNA は化学合成により得た。siRNA は Elbashir et al (2001)
10 のプロトコール (Elbashir, S.M., *Nature* 411: 494-498. 2001) に従って作製した。対数増殖期の細胞をトリプシン処理し、96-well プレート (1×10^3 個/well)に移した。24 時間後、1 ウェルあたり 20pmol の siRNA をウェルに入れ、LipofectAMINE 2000 (Invitrogen, San Diego, CA)を用いてキットの説明書に従って 3 日間トランスフェクションを行った。siRNA 細胞の増殖を決定するために、Alamar Blue (Biosource
15 International)を用いて、キットの説明書に従って細胞増殖アッセイを行った。

(3) 結果

NIH3T3 において、Fli-1 はシノビオリン転写活性を抑制し、GABP α はその転写活性を増加させる結果が得られた (図 3a、b)。また、GABP α 、GABP β の RNAi
20 にてノックアウトした NIH3T3 細胞では、シノビオリンの転写も低下が認められた (図 3c)。これらのことから NIH3T3 において、GABP α/β 複合体がシノビオリンの発現を担っていることが考えられた。

さらに、その GABP α/β 複合体が EBS を介してシノビオリンの転写活性を担っていることを証明するため、EBS (G-76T) 変異体および EBS wild をもつプロモーター (-200 から +843) を使用し転写活性アッセイを行った。

25 その結果、変異体が全く活性化されないにもかかわらず、野生型では約 3 倍の転写活性化がみられた。

(4) ウェスタンブロッティング

最後に NIH3T3 を 200nM のデコイで処理した後、シノビオリンの発現をウェスタンブロッティングにて評価した。

30 ウェスタンブロット解析は以下の通り行った。すなわち、細胞培養物を回収し、

1% NP-40, 25mM Tris-HCl, pH6.8, 0.25%SDS, 0.05%2-mercaptoethanol and 0.1% glycerol を含む溶液中で溶解させた。透明な細胞溶解物のアリコートに SDS-ポリ
アクリルアミドゲル上で分離した。分離したタンパク質をニトロセルロース膜に
移し、抗シノビオリンモノクローナル抗体を用いてイムノブロットを行った。結
5 合した抗体を、ペルオキシダーゼ結合ヤギ抗マウス免疫グロブリン及び ECL 検
出システム(Amersham Pharmacia Biotech)により検出した。

その結果、EBS 野生型で処理したシノビオリンの発現は約半分に低下した。

これらのデータから GABP α/β により EBS を介して、シノビオリンの転写が
制御されていることが示された。

10

〔実施例 5〕 マウス胚におけるシノビオリンの発現に必須の部位の同定

次に、マウスの胚において in vivo における EBS の効果を確認するため、シノ
ビオリン プロモーター に LacZ を結合したプラスミドを過剰発現させたラン
スジェニックマウスを作製した。Tg は全長 3k と 1k のプロモーターとそれぞれ 1
15 塩基変異を入れたプロモーターを過剰発現させた 4 種類を作製した (図 4a)。

トランスジェニック (Tg) マウス用のコンストラクションと Tg マウスの作製
は以下の通り行なった。

SyG-2.2k/BV2 から NotI と NcoI で約 3k の断片を抜き出した後、SyTB/pbs へ挿
入し、SyL-2.2kwt/pbs を作製した。さらに、SyL-2.2kmG-76T/pbs、SyL-200wt/pbs
20 及び SyL-200mG-76T/pbs を、それぞれ SyG より取り出した断片を用いて作製した。
各構築物について、それぞれ QIAGEN Plasmid Kit (QIAGEN) を使用し精製後、
ScaI にて線状化した DNA を BDF マウス (C57BL/6N と DBA/2N の交配による仔
マウス) の受精卵の核内に直接マイクロインジェクションし、仮親の卵管に移植
した。それぞれ、8 から 9 母胎より誕生したマウスの尾からゲノムを抽出し、サ
25 ザンブロット法にて Tg マウスであることの確認を行った。

これらの Tg マウスからシノビオリンの発現を検討するため、胚による X-gal
染色を行った。その LacZ をノックインしたノックアウトマウスの胚における
LacZ の発現と今回作製した 4 つの Tg マウスの発現を比較検討した。

シノビオリンの 11.5 から 14.5 d.p.c (days post coitus : 胎齢) の胚を使用し、LacZ
30 染色を行った。3k と 1k の プロモーターを導入したトランスジェニックマウスは、

ヘテロノックアウトマウスとほぼ同じ部位に染色がみられた。驚いたことに、1塩基変異を導入した3kと1kのプロモーターを導入したトランスジェニックマウスは、そのどちらも発現部位がその系によりランダムになることが確認された(図4b)。

- 5 転写活性化に必要な領域がなくなると、上記結果と同様の結果が得られることが報告されている(pax5,col11a2等)。これらのことから、EBSは、シノビオリンの転写に必須の部位であることが判明した。

- さらに、その発現とGABP α の発現を13.5 d.p.cの胚を用いて比較したところ、ほぼ同様の部位に発現していることが判明した(図4c)。以上の結果より、胚発生
10 においても、in vitroの結果と同様、GABP α がEBSを介してシノビオリンの発現を制御していることが示された。

[実施例6] RA滑膜細胞におけるシノビオリンの発現

- リウマチの滑膜細胞におけるEBSを介したGABP α の効果について検討を行ったところ、滑膜細胞の核抽出液を用いたゲルシフトにおいても、NIH3T3の各抽出液のときと同様にGABP α にてスーパーシフトが得られた。さらにそのEBSのリウマチ滑膜細胞における意義、すなわちGABP α によるEBSを介した転写制御がシノビオリンの発現抑制につながり、最終的に滑膜細胞の増殖抑制となるかことを確認するため、EBSデコイによるシノビオリンの発現抑制について検討した。
20 その結果、約半分にその発現の低下が認められた(図5)。

以上の結果から、RA滑膜細胞においても、GABP α/β がシノビオリンの構成的遺伝子発現を担っていることが証明された。

[実施例7] アネキシンVによる染色とFACS解析

- 25 NIH3T3細胞をトリプシン処理し、冷PBSで2回洗浄し、1×annexin-binding buffer (Vybrant apoptosis assay kit, invitrogen) に懸濁し、 1×10^6 cells/mlの濃度となるように調製した。1試験あたり、細胞懸濁液100 μ lを使用した。5 μ gのFITC標識アネキシンVおよび1 μ lのPI working solutionを加え、室温で15分間インキュベートした後、400 μ lの1×annexin-binding bufferを加え、ゆっくり攪拌した後、FACSCalibur (Becton Dickinson社)により解析を行なった。
30

また、シノビオリンは ER ストレスにより誘導されるアポトーシスに抵抗性を持つことから、シノビオリンの量とアポトーシスの関係を明らかにするために以下の実験を行なった。

NIH3T3 細胞を調製し、24 時間後に GFP 又は Synoviolin の siRNA(25nM)を、
5 LIPOFECTAMINE 2000 (Invitrogen)を用いて NIH3T3 細胞にトランスフェクトし、84 時間インキュベートした。また、上記と同様にして EBS デコイ ODN を作製し、これを NIH3T3 細胞にトランスフェクトした。

その結果、NIH3T3 細胞において、シノビオリンの RNAi によりシノビオリンの発現量を低下させたところ、アポトーシスが誘導された (図 6 a)。図 6 a において、上パネルはウエスタンブロッティングの結果を示し、下パネルは NIH3T3
10 細胞の顕微鏡写真である (100 倍)。同様に、EBS デコイ核酸を用いてシノビオリンの転写阻害による影響をみたところ、NIH3T3 細胞においてアポトーシスが誘導された (図 6 b)。図 6 b において、上パネルはウエスタンブロッティングの結果を示し、下パネルは NIH3T3 細胞の顕微鏡写真である (100 倍)。

15 さらに、シノビオリンを過剰発現する NIH3T3 細胞を作製し (図 7 a)、EBS デコイ核酸による影響を検討した。

Synoviolin を過剰発現する安定細胞株の樹立については、LIPOFECTAMINE 2000 (Invitrogen)による NIH3T3 細胞のトランスフェクションの 24 時間後、細胞を新鮮増殖培地で 10 倍希釈して継代した。翌日、選択培地 (G418 を $0.5 \mu\text{g/ml}$ 含有)
20 を添加し、HA-Synoviolin-HAHA/pcDNA3 発現ベクターを安定発現するクローンを得た。なお、対照として又は HA- pcDNA3 空ベクターを使用した。各細胞株においてプラスミドからの発現を確認するため、HA tag に対する抗体を用いてウエスタンブロッティングを行った。

また、EBS デコイ ODNs によるアポトーシス誘導については、次の通り実験を行った。
25

FUGENE6 (Roche)試薬による EBS のトランスフェクションを行って 84 時間後に、細胞を回収してマイクロチューブに入れ、Annexin V-FITC でラベルした。FACS 分析により、生細胞とアポトーシスを起こした細胞との分布状態を測定した。さらに、Synoviolin 抗体を用いたウエスタンブロッティングも行った。なお、対照
30 として β -アクチン抗体を使用し、安定発現の確認用として HA-抗体を使用した。

結果を図 7 に示す。シノビオリン過剰発現細胞では EBS デコイ核酸によるアポトーシスに抵抗性を持つ結果となった (図 7 b、図 7 c)。加えて、アネキシン V を用いた FACS によるアポトーシスの定量化を行なったところ、通常の NIH3T3 細胞においては 51.1% がアポトーシスを起こしていたが、シノビオリン過剰発現細胞では、その割合が 29.8% であった (図 7 d)。図 7 c は、100 倍の倍率による NIH3T3 細胞の顕微鏡写真である。

以上のことから、EBS を介して転写調節を抑制すると、シノビオリンの発現が抑制され、NIH3T3 細胞のアポトーシスが誘導されることが示された。

10 産業上の利用可能性

本発明により、シノビオリンのプロモーターが提供される。本発明のプロモーターは、シノビオリンの発現を制御すること、また、シノビオリンが発現する部位に、有用遺伝子を発現させることにより、各種疾患 (例えばリウマチ) の治療に用いることができる点で有用である。

15

配列表フリーテキスト

配列番号 3 : 合成 DNA

配列番号 4 : 合成 DNA

配列番号 5 : 合成 DNA

20 配列番号 6 : 合成 DNA

配列番号 7 : 合成 DNA

請求の範囲

1. 配列番号 1 又は 2 に示す塩基配列のうち少なくとも 2120～2130 番目の塩基配列を含む、シノビオリン遺伝子のプロモーター。
- 5 2. 配列番号 1 又は 2 に示す塩基配列のうち少なくとも 1～2201 番目、969～2201 番目、1142～2201 番目、1699～2201 番目、1880～2201 番目、2002～2201 番目、2094～2201 番目及び 2118～2201 番目の領域の塩基配列からなる群から選ばれるいずれかの塩基配列を含む、シノビオリン遺伝子のプロモーター。
- 10 3. 配列番号 1 に示す塩基配列のうち少なくとも 1～3043 番目、969～3043 番目、1142～3043 番目、1699～3043 番目、1880～3043 番目、2002～3043 番目、2094～3043 番目及び 2118～3043 番目の領域の塩基配列からなる群から選ばれるいずれかの塩基配列を含む、シノビオリン遺伝子のプロモーター。
- 15 4. 配列番号 2 に示す塩基配列のうち少なくとも 1～3092 番目、969～3092 番目、1142～3092 番目、1699～3092 番目、1880～3092 番目、2002～3092 番目、2094～3092 番目及び 2118～3092 番目の領域の塩基配列からなる群から選ばれるいずれかの塩基配列を含む、シノビオリン遺伝子のプロモーター。
5. 以下の(a)又は(b)のプロモーター。
 - (a) 請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載のプロモーターの塩基配列の一部の領域に欠失、置換若しくは挿入が生じ、かつ、プロモーター活性を有する塩基配列を含む、シノビオリン遺伝子のプロモーター
 - 20 (b) 請求項 1～4 のいずれか 1 項に記載のプロモーターの塩基配列に相補的な配列とストリンジェントな条件下でハイブリダイズし、かつ、プロモーター活性を有する塩基配列を含む、シノビオリン遺伝子のプロモーター
- 25 6. 請求項 1～5 のいずれか 1 項に記載のプロモーター、発現の目的遺伝子及びターミネーターを含む遺伝子発現カセット。
7. 請求項 6 記載の遺伝子発現カセットを含む組換えベクター。
8. 請求項 7 記載の組換えベクターを含む形質転換体。
9. 請求項 1～5 のいずれか 1 項に記載のプロモーターの活性を阻害又は促進することを特徴とする、転写活性調節方法。
- 30 10. プロモーターの活性の阻害又は促進が、転写因子の結合活性を阻害又は促

進するものである請求項 9 記載の方法。

1 1. 転写因子の結合部位が Ets 結合部位である請求項 1 0 記載の方法。

1 2. 転写因子が、GABP α 、GABP β 、GABP α と GABP β との複合体、Ets1、Pea3、Tel 及び Fli-1 からなる群から選ばれるいずれかのものである請求項 1 0

5 又は 1 1 記載の方法。

図1a

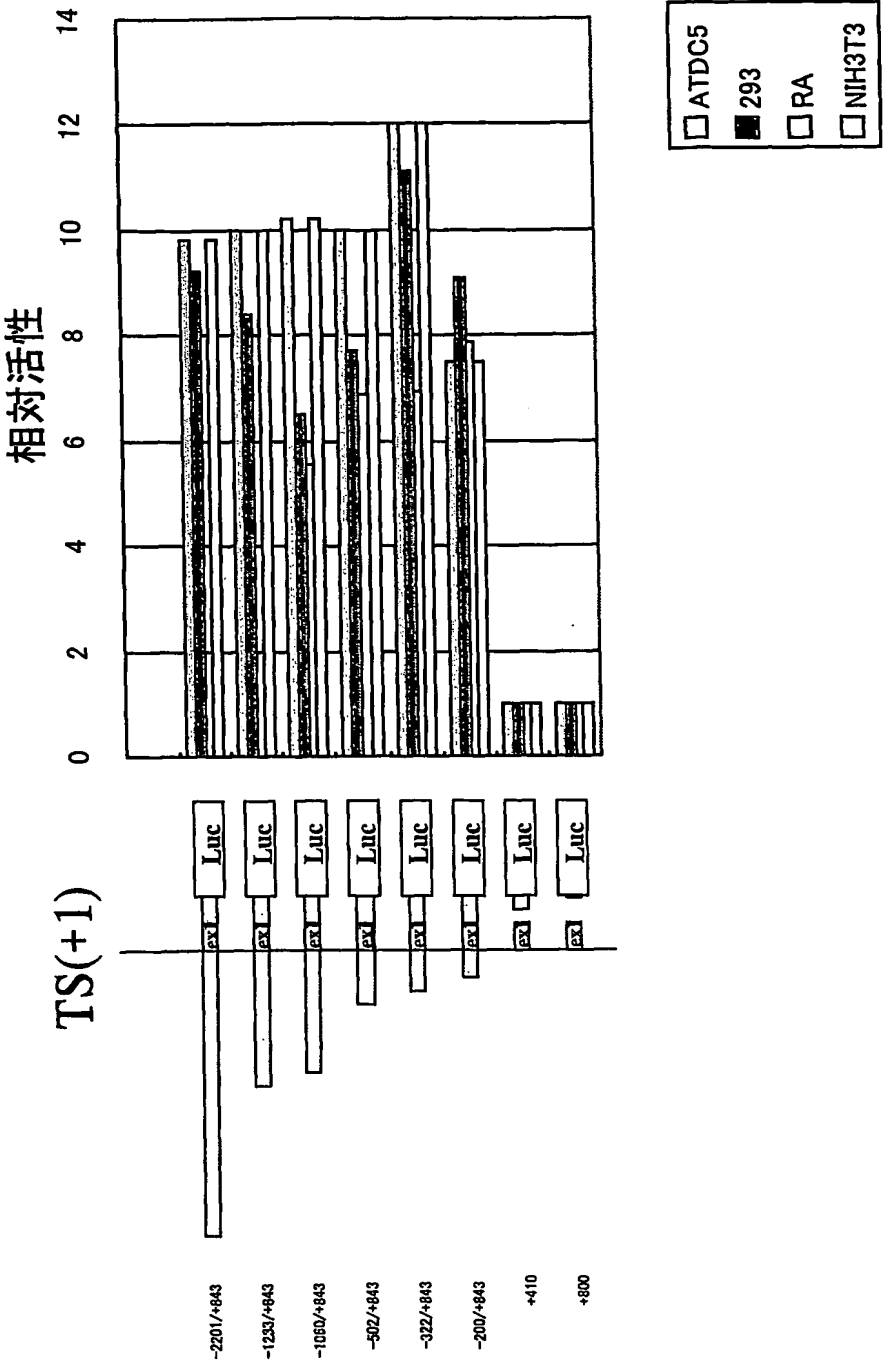


図1b

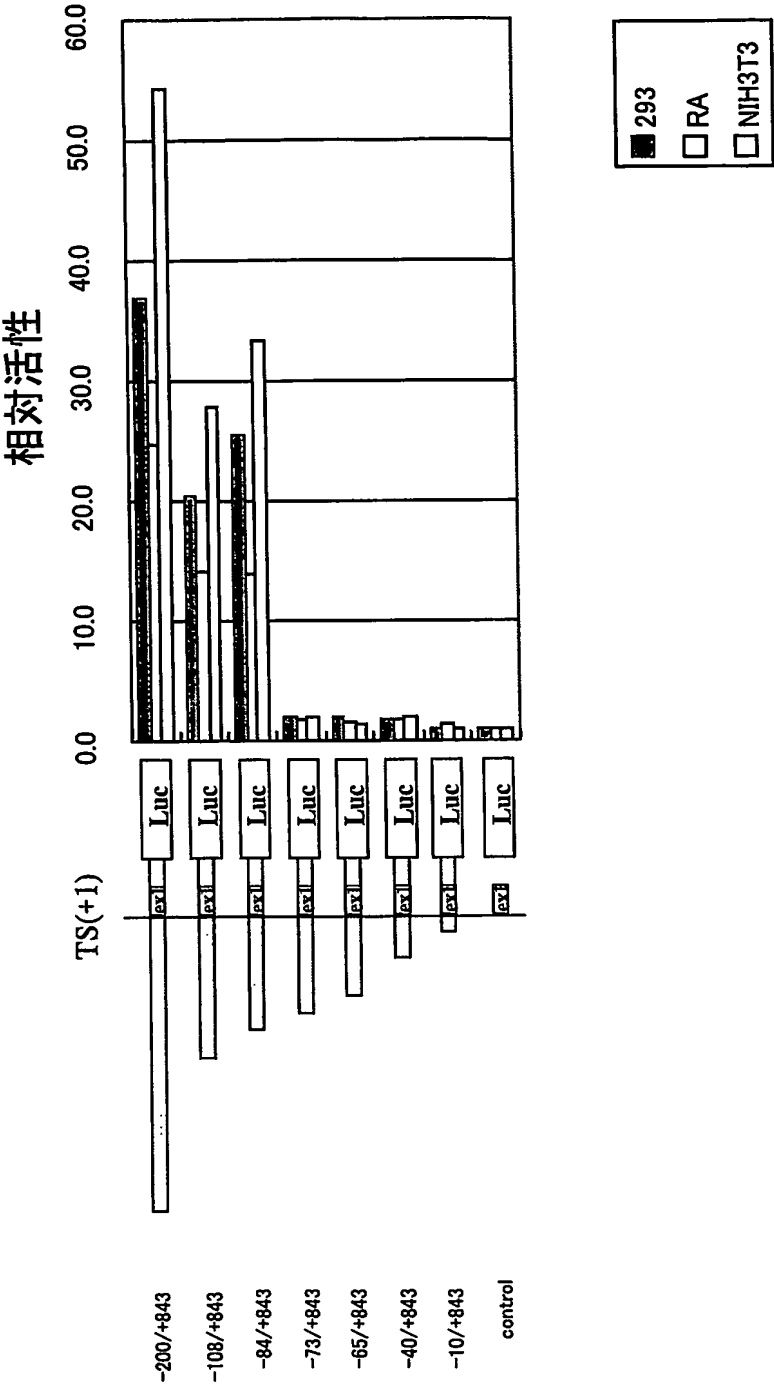


図1d



Mutants		Wild type	mutation
ABS(AML binding site)	TGAGGTT	TGAGGTT	
EBS(Ets binding site)	GCCGGAAGTGA	GCCGGAAGTGA	GCCIGAAAGTGA
SBS(Sp1 binding site)	GCCGCCGCC	GCCGCCGCC	GCCAAAGCCCC

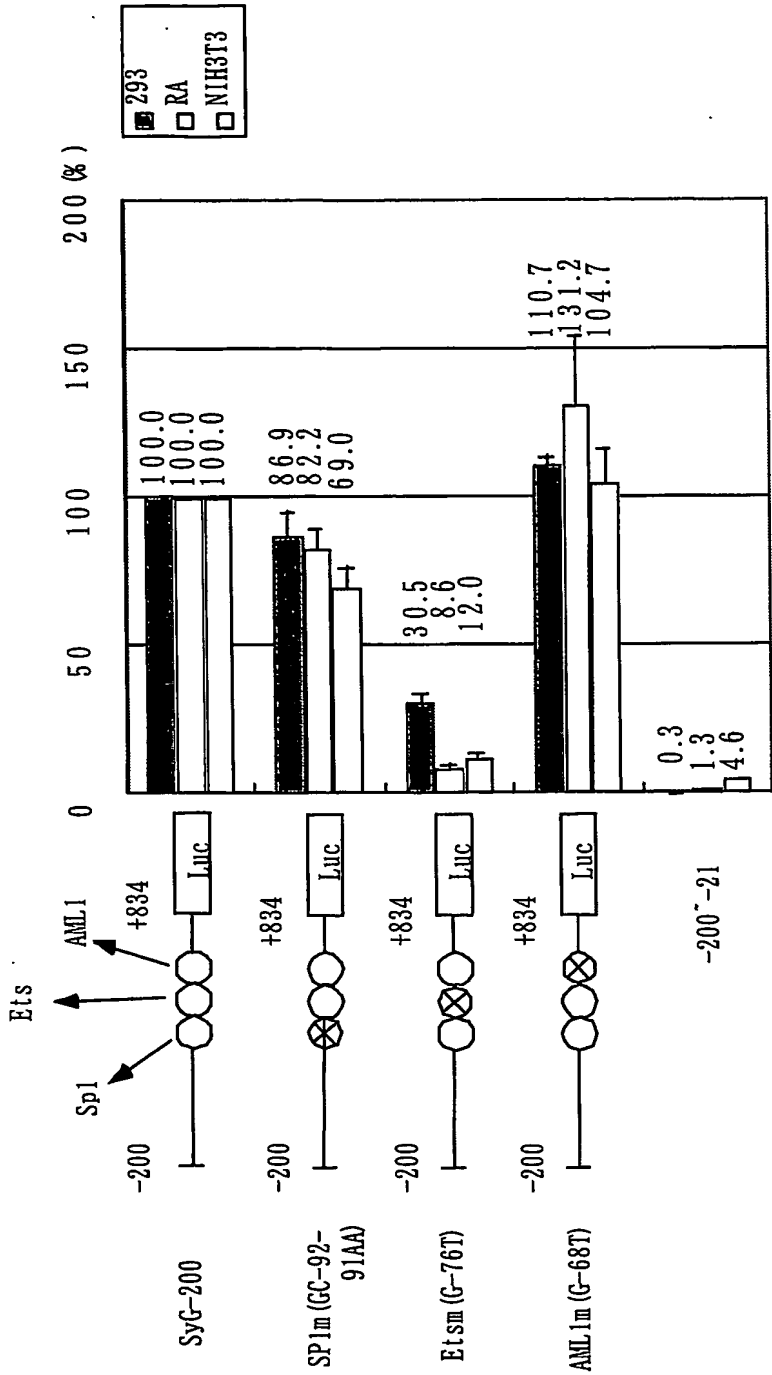


図2a

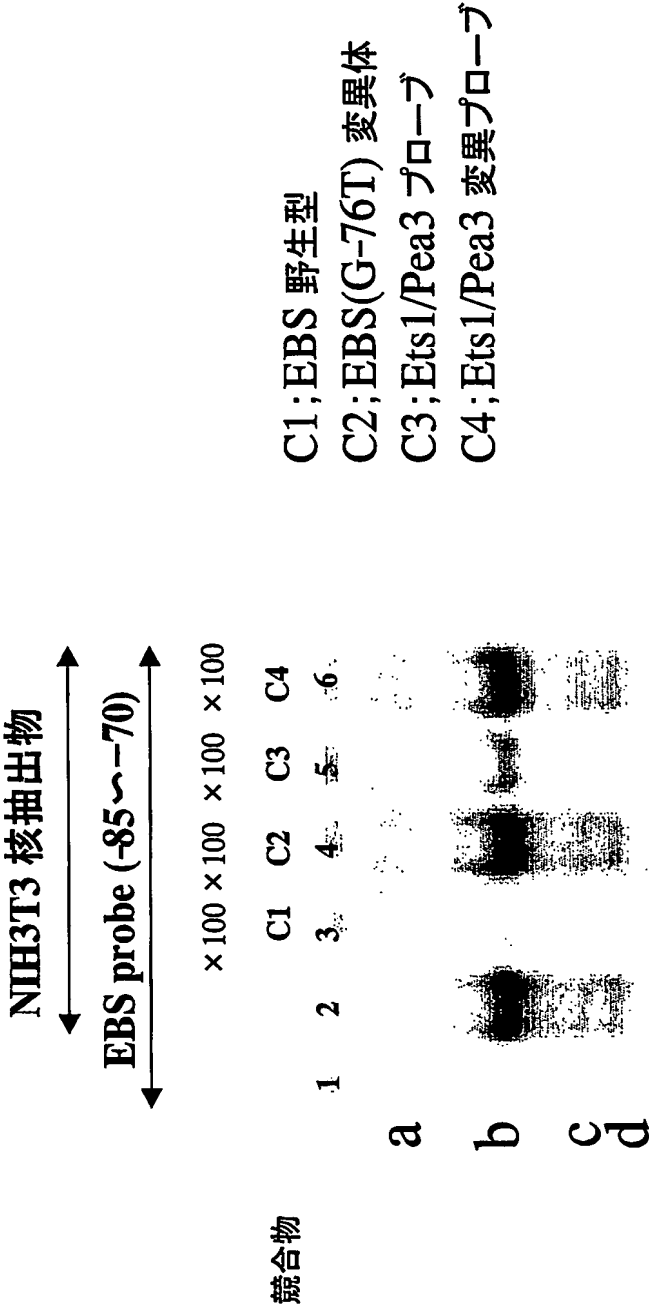


図2b

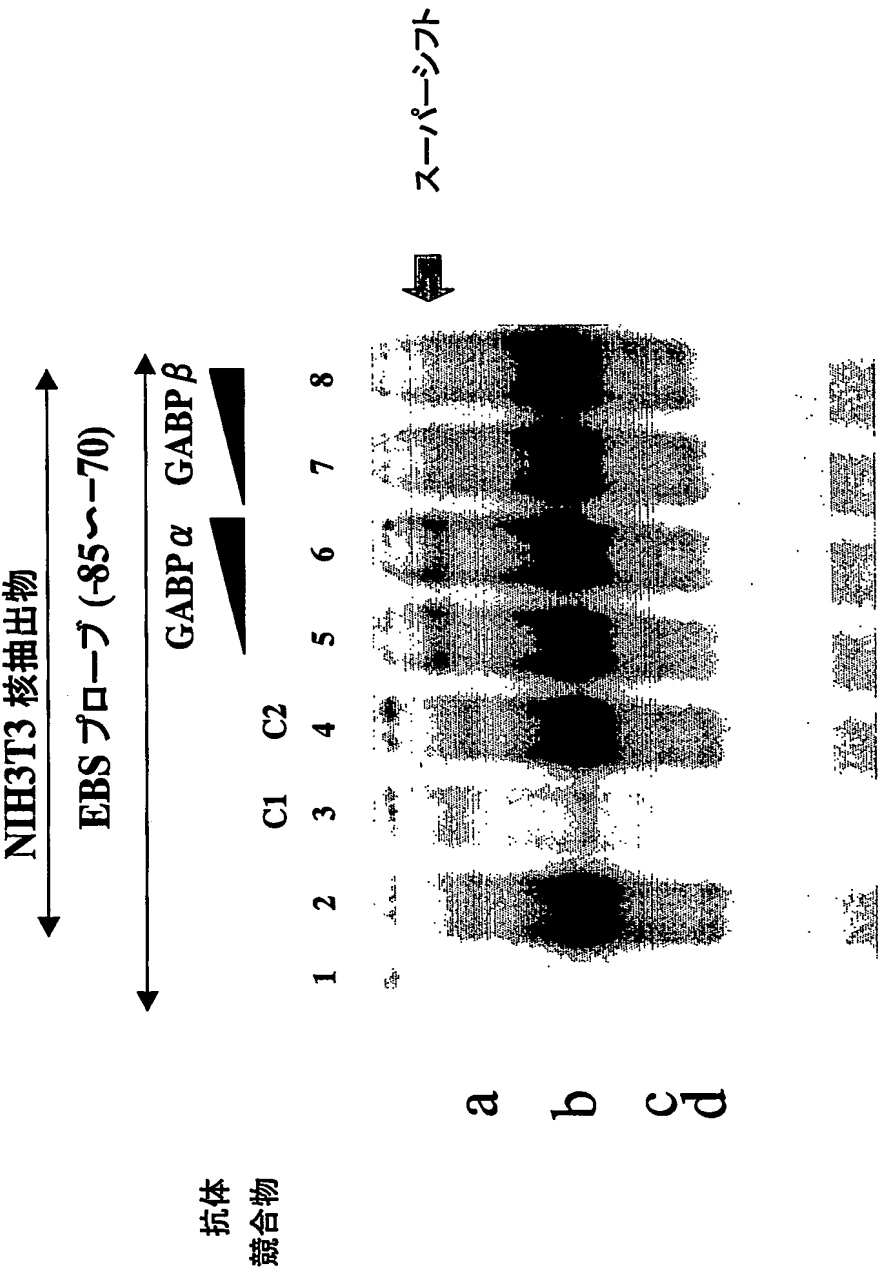


図2c

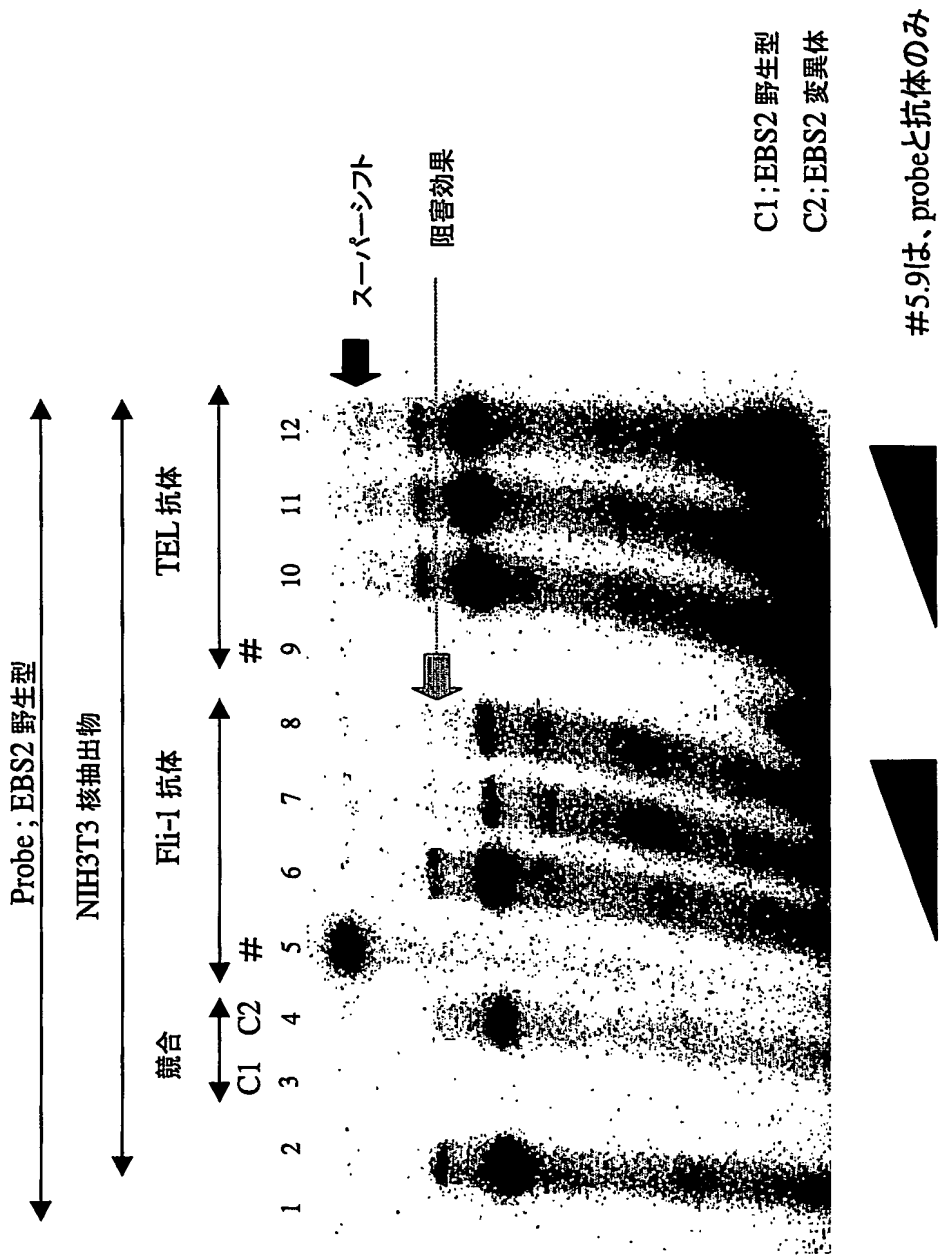


図2d

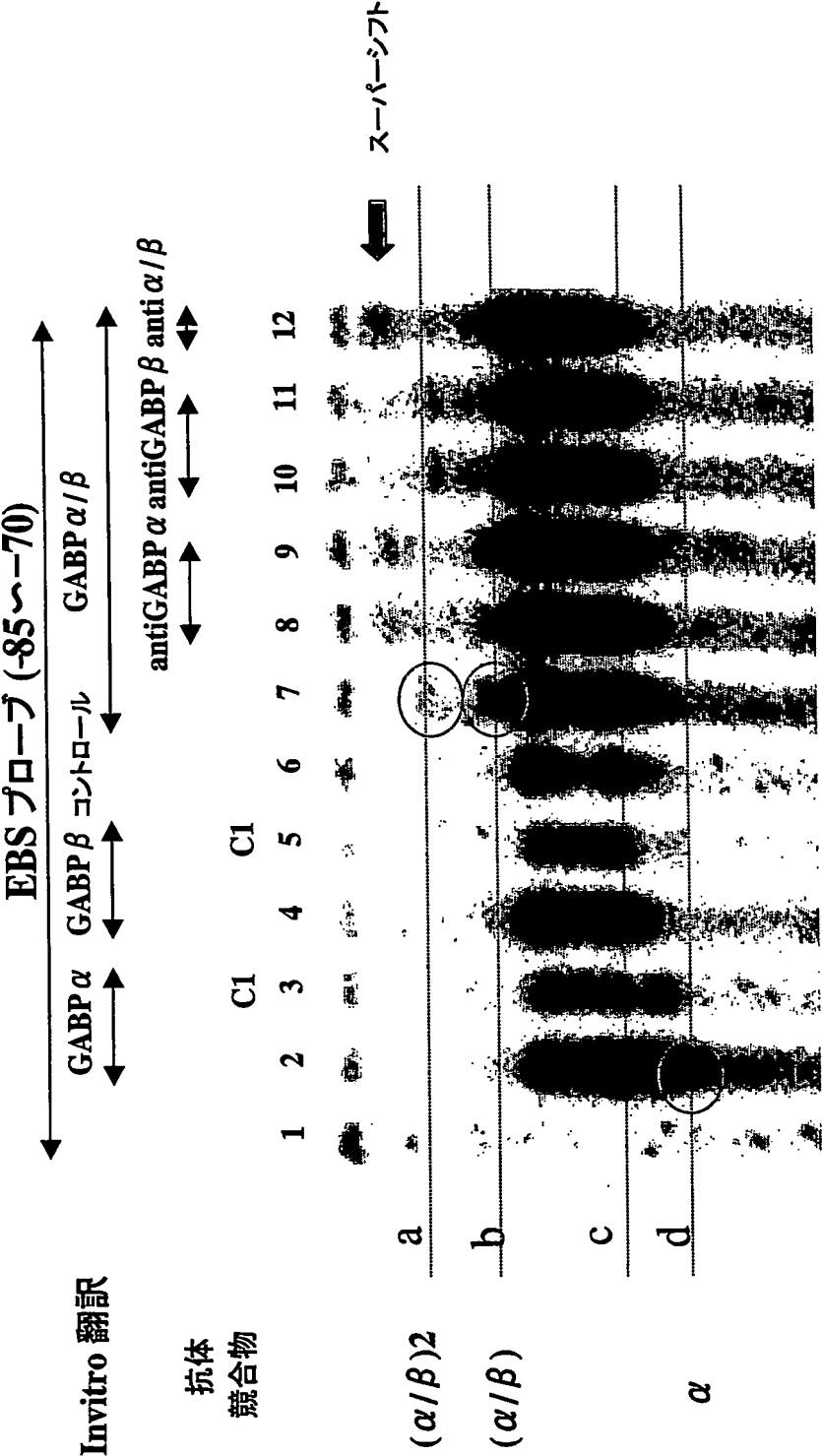


図 3a

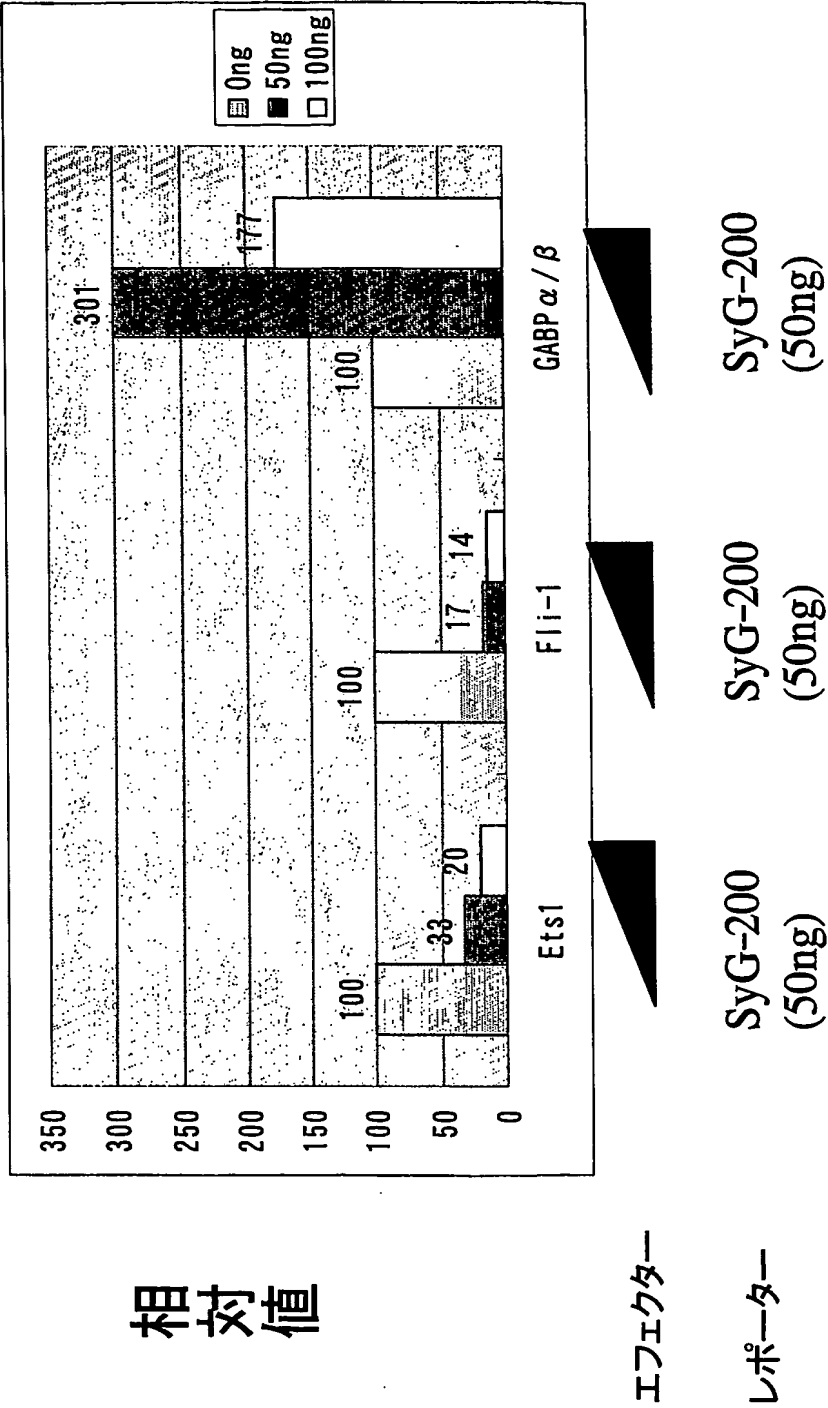
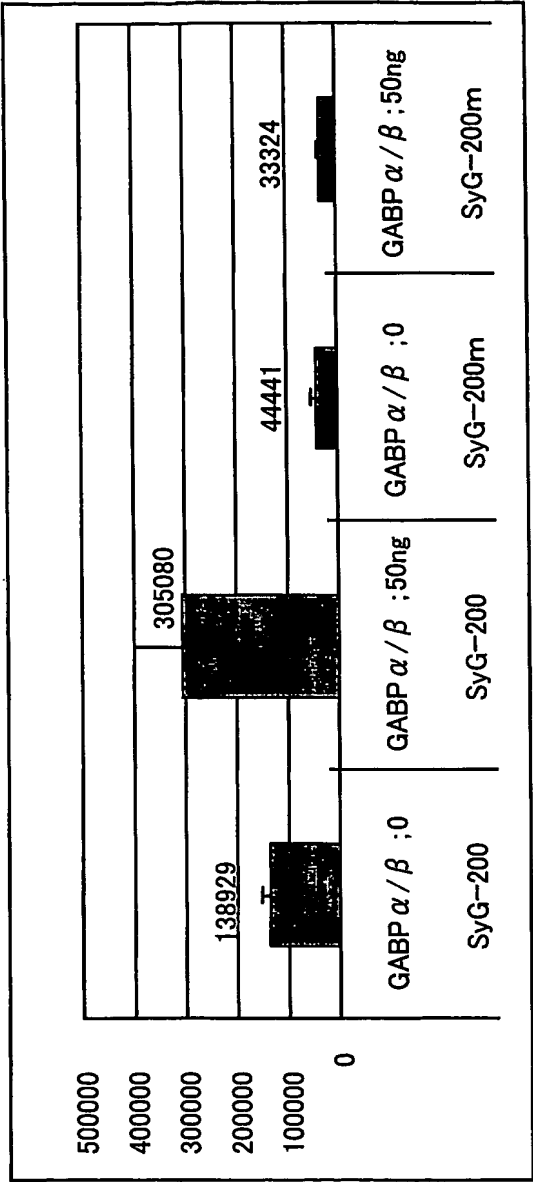


図3b



補正值

変異体

野生株

レポーター(50ng)

図3c

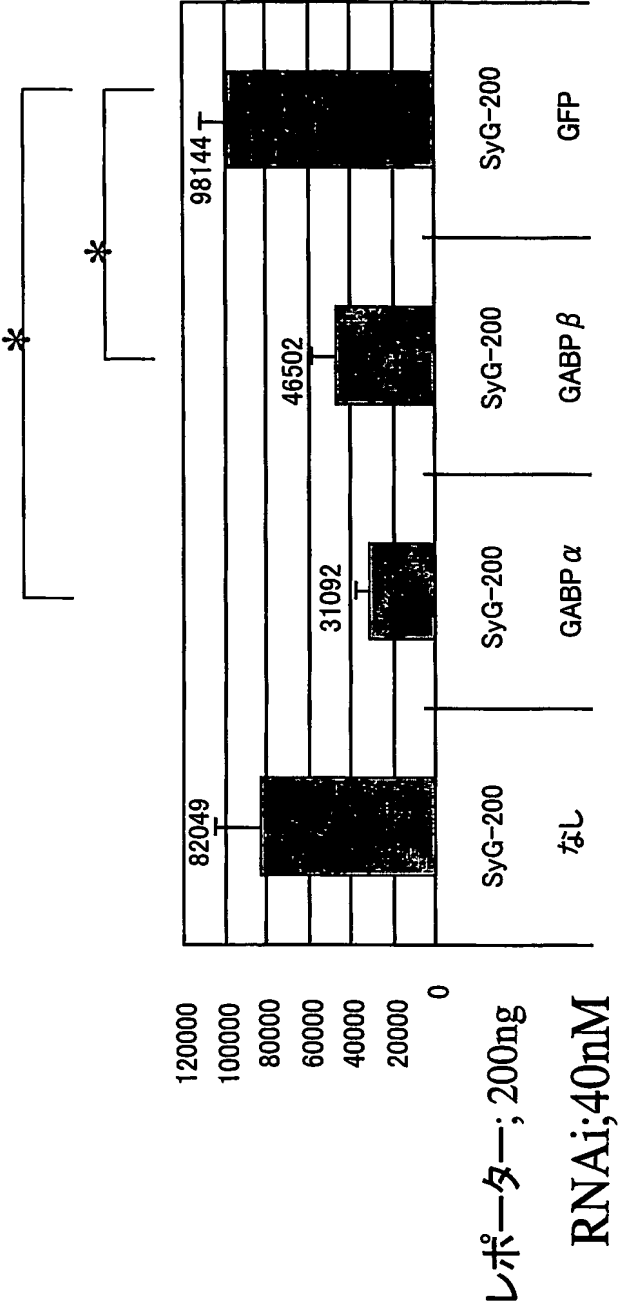


図4a

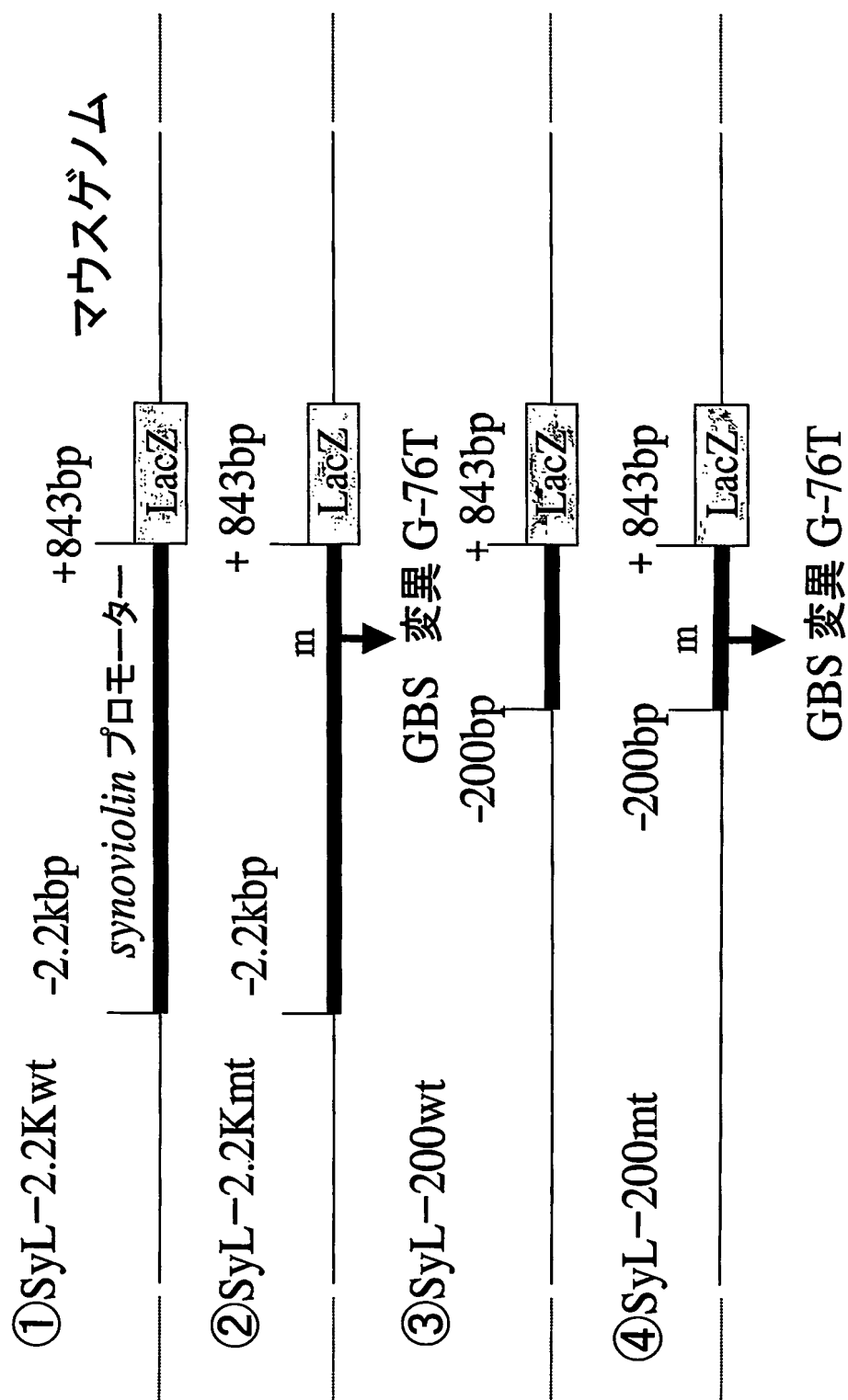


図4b

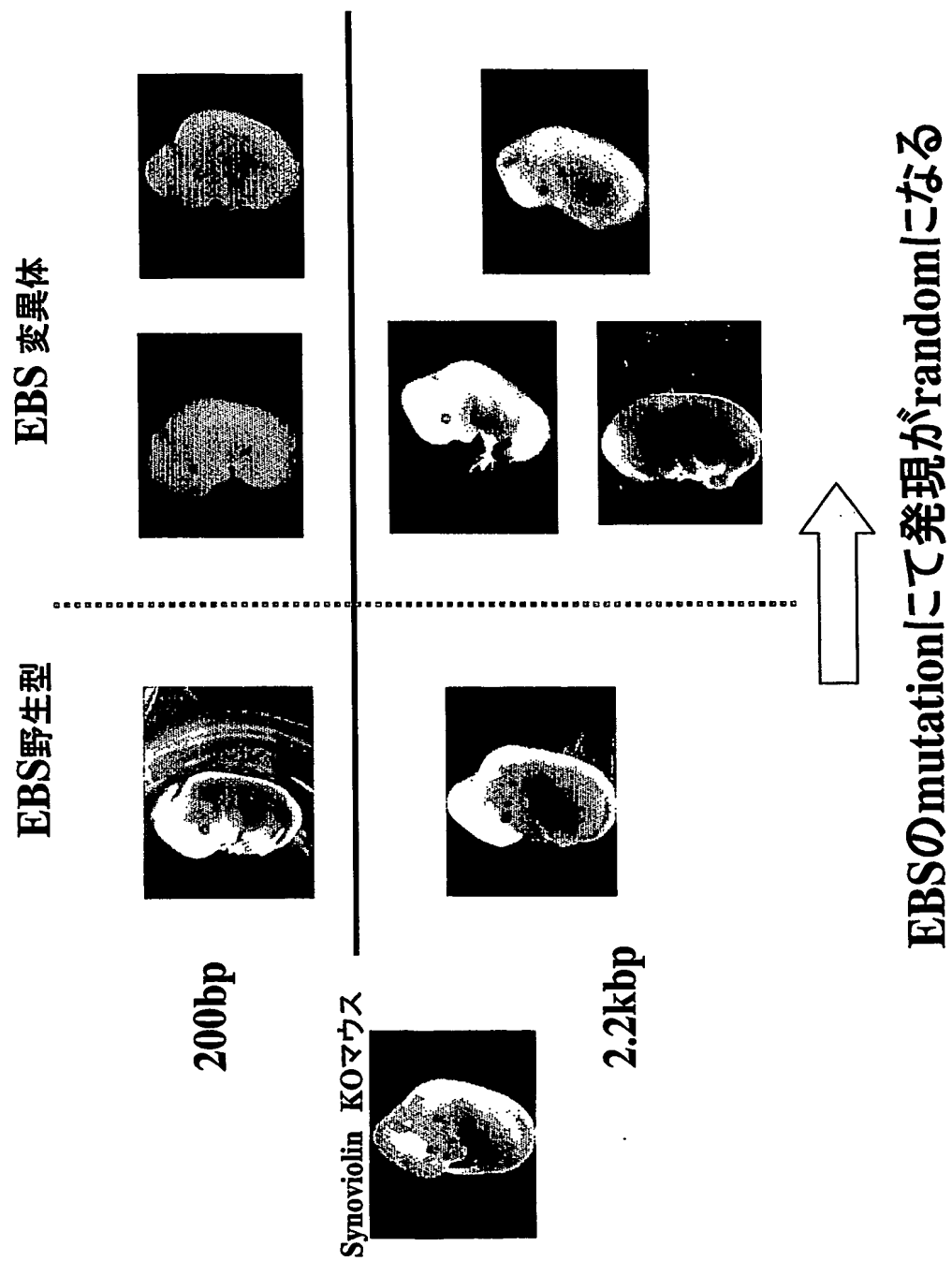


図4c

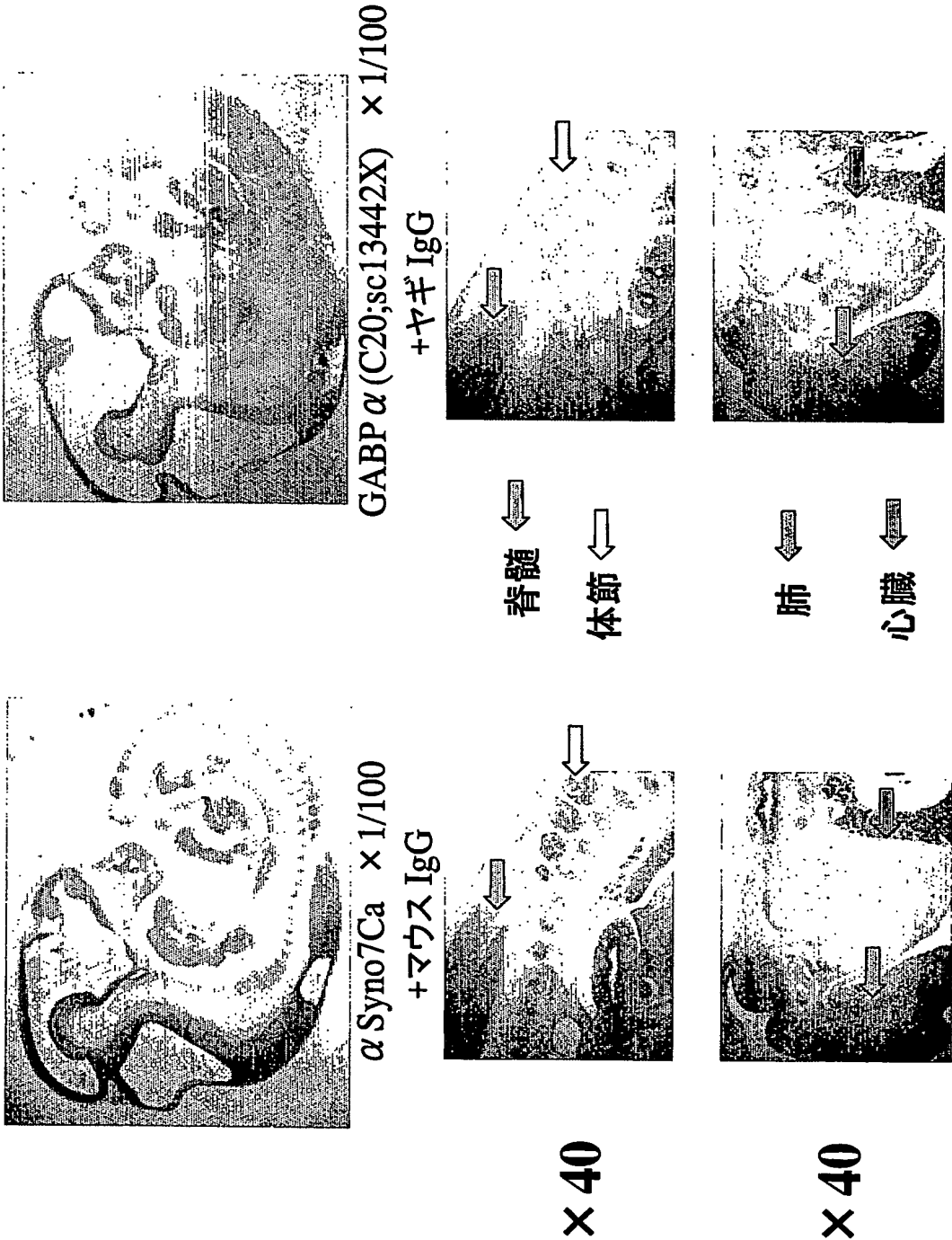


図5

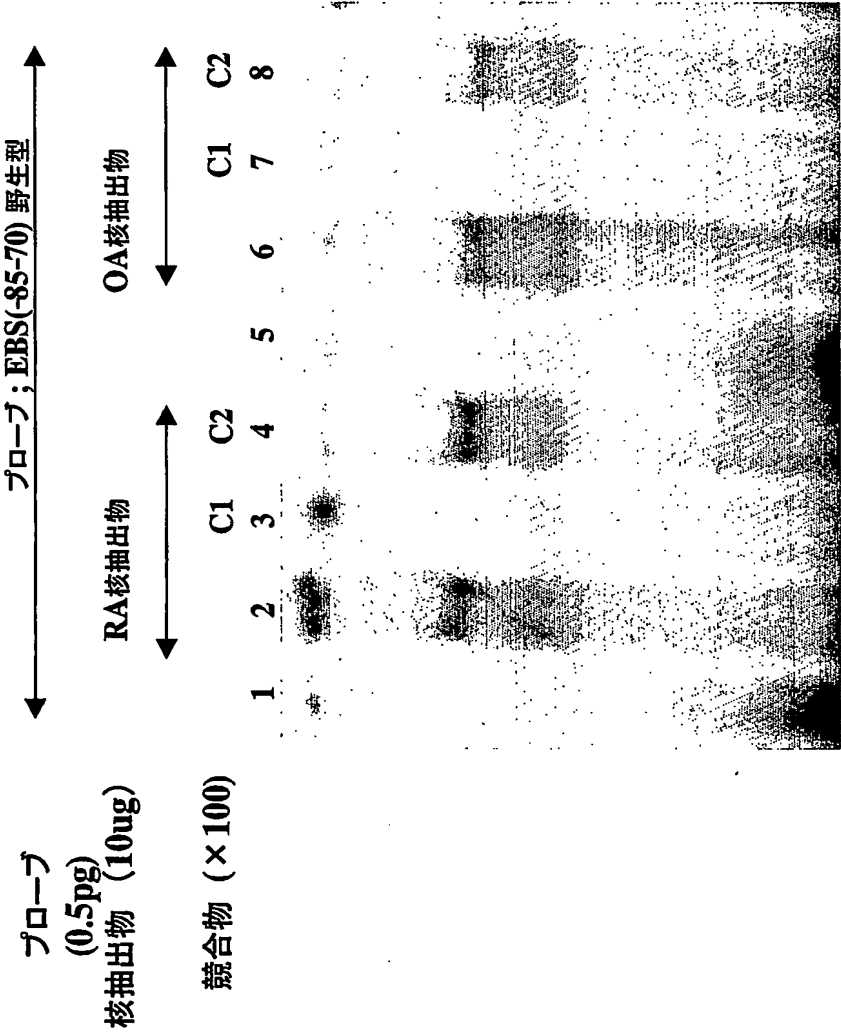


図6a

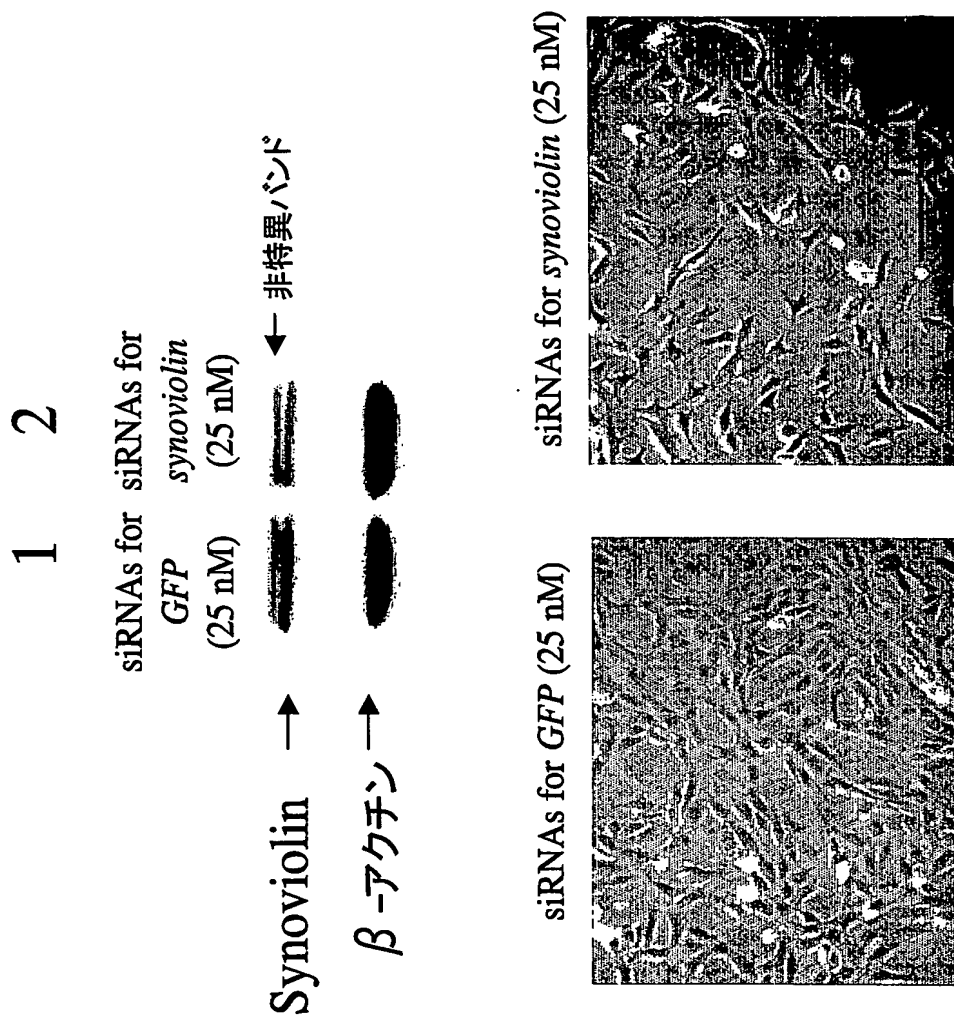


図6b

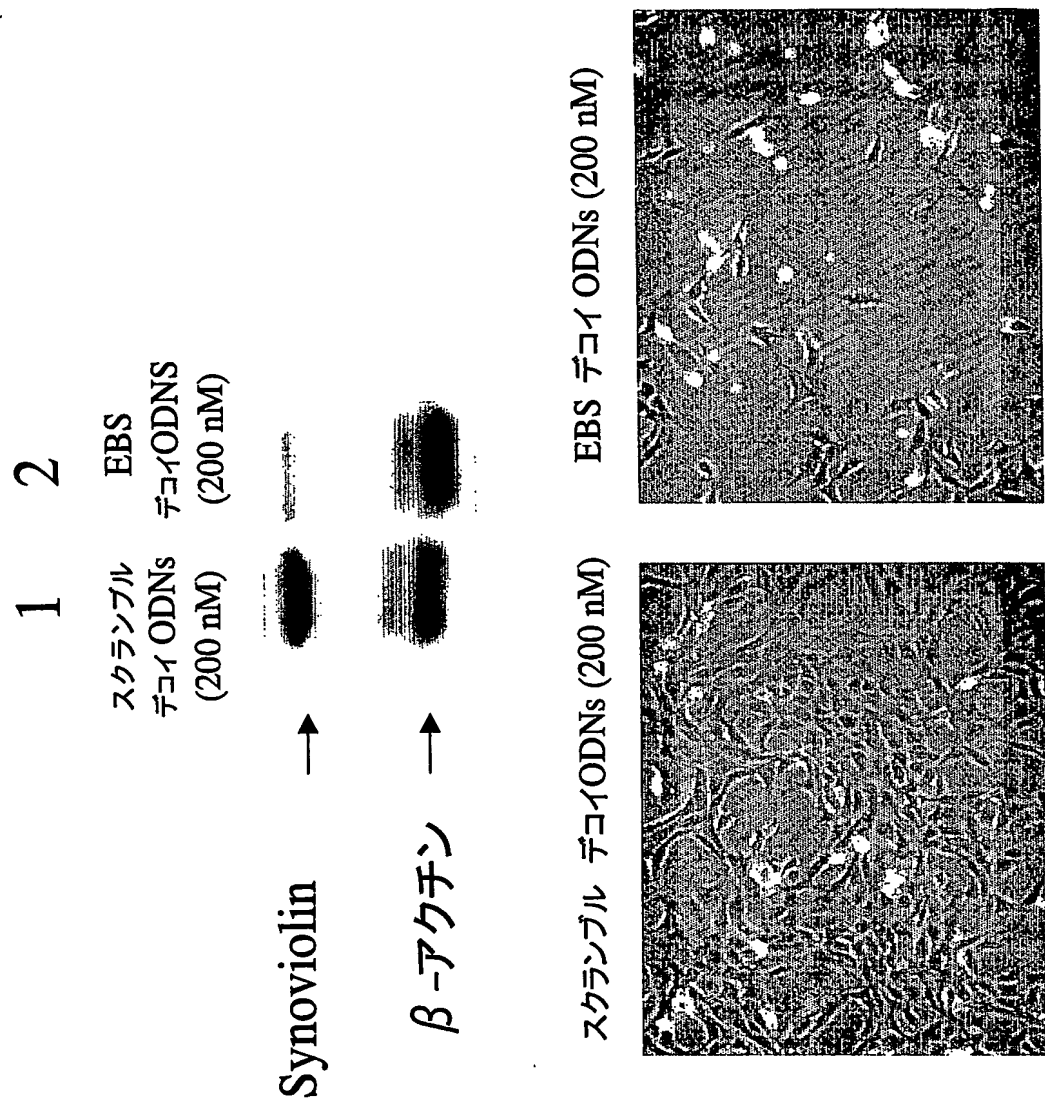
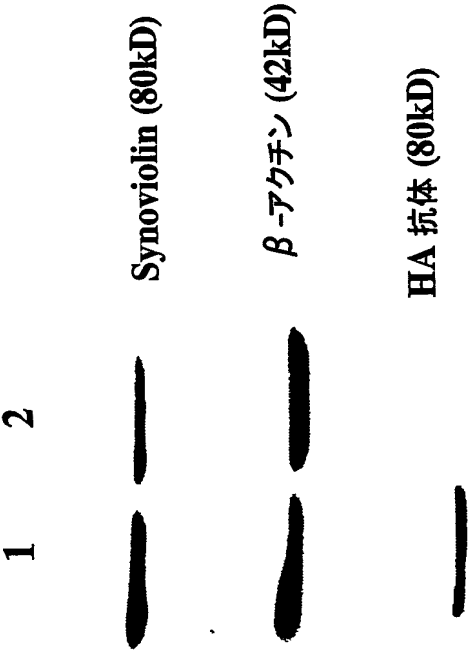


図7a



1: Synoviolin 過剰発現安定細胞株

2: pcDNA3過剰発現安定細胞株

図7b

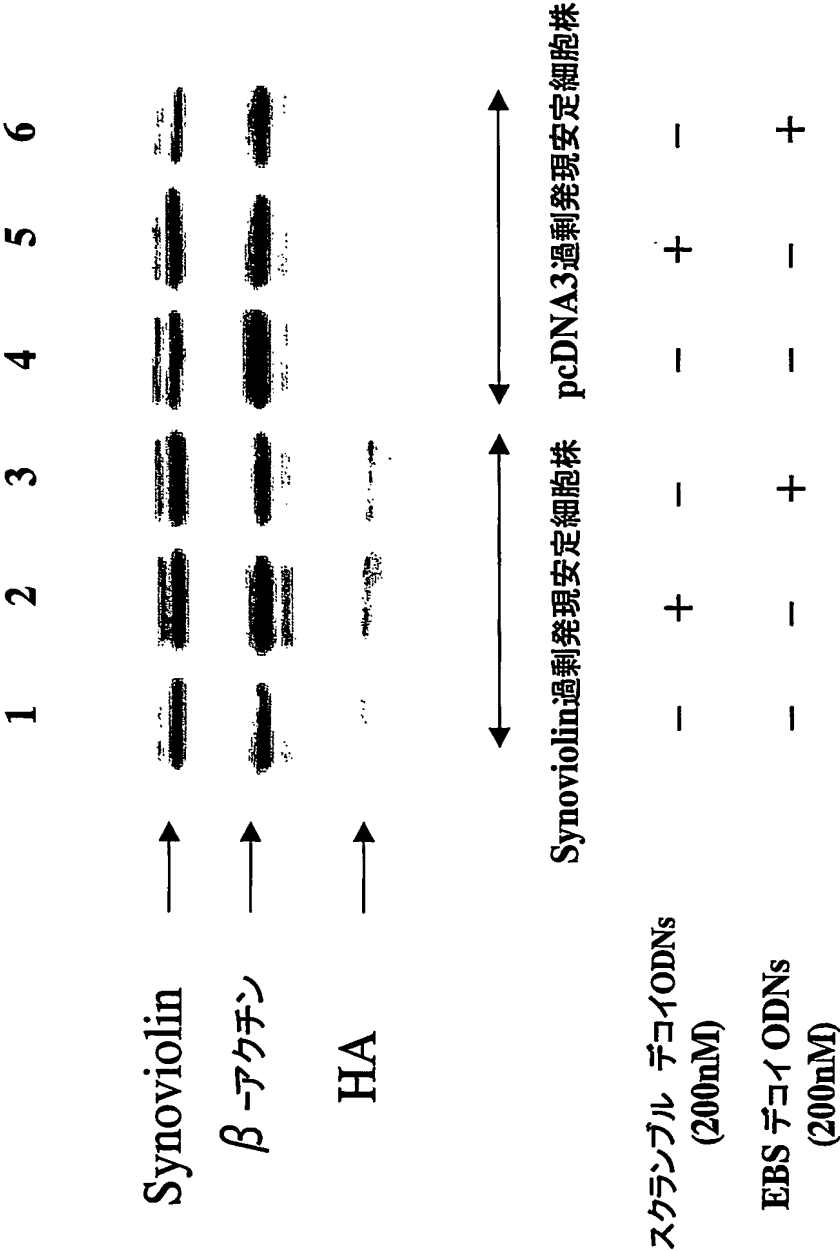
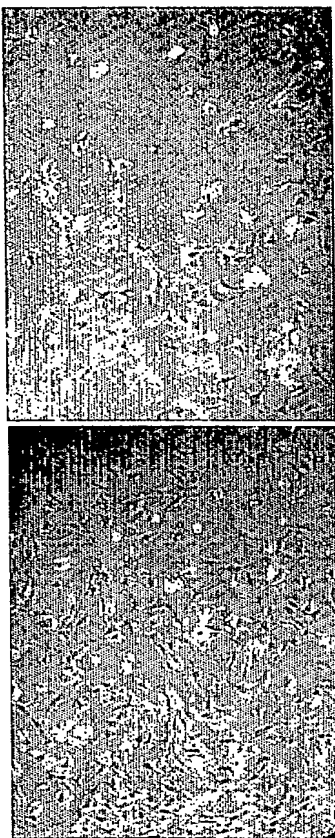


図7c

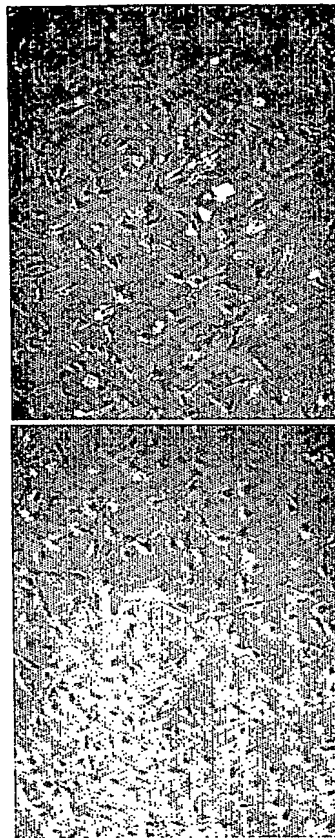
スクランブル デコイODNs (200 nM) EBS デコイ ODNs (200 nM)



ベクターなし (pcDNA3)

過剰発現安定細胞株

スクランブル デコイODNs (200 nM) EBS デコイ ODNs (200 nM)

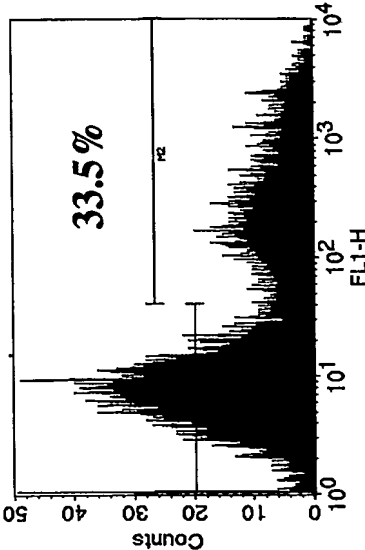


Synoviolin

過剰発現安定細胞株

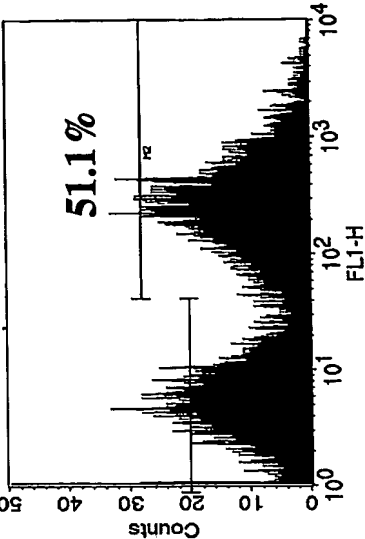
図7d

スクランブルデコイODNs
発現 (200 nM)

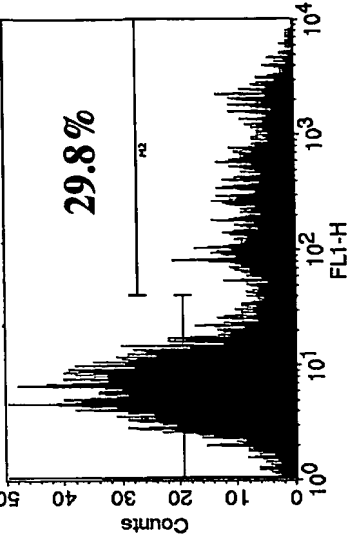
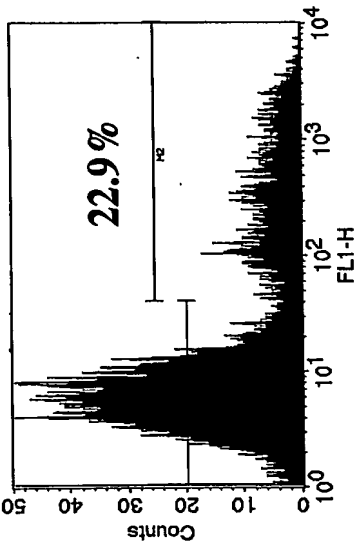


ベクターなし (pcDNA)
過剰発現安定細胞株

EBS デコイ ODNs
発現 (200 nM)



Synoviolin
過剰発現安定細胞株



SEQUENCE LISTING

<110> Locomogene, Inc.

<120> Synoviolin promoter

<130> P03-0115PCT

<150> JP2003-297913

<151> 2003-08-21

<160> 7

<170> PatentIn version 3.2

<210> 1

<211> 3046

<212> DNA

<213> Mus musculus

<400> 1

```

gcaagagacc ttatTTTgtt tttcgagaca gggTTTctct gtgtagccct ggctgtccta      60
gaactcactc tgtagaccag gctggcctcg aactcagaaa tccgcctgcc tctgcctccc      120
gagtgtctggg attaaaggta ggcgccacca cgcccagctt tttttttttt agataggatc      180
tcactctata gctgtacgct ggcctcagat ttatgatgct cttcctgcct cagtctccca      240
attttctggg attgtaggag tgggccacta tgctctgctc actacatgat ttcagagggt      300
gagtagacct gaactgaaga ccagacaagg gagccctccc tcgacatctt ggggccaggg      360
aagttgaagc cataggatca gaggaaatgt ggcaagaaaa aaggccaaca tggacacaga      420
acttaaataa aaacagacag aggaagtaag acagatatat acctggggga gaggagggat      480
tgccacaaaa tgtaggagat tttcaagaat gggggaggat gagtgtgtag ggttaaaggt      540

```

agccagtaga agttcatagc tagccttatg gaggaaggaa aggggagcca tctcgggatg 600

ttaactgtta aagacaacag gtggtggtga agatggctga gaccaagagc acagggctga 660

ggggcagaca ggcaactgaca ctgctaccct ttaatacagt tcctcctgtt gtgatcccca 720

accataatta cttcgttgct acttcataac tgtaattttg ctagttatga attgtaagta 780

aacgtctgat atgcaggata tctcatttgt gaccctgtg taacggtttg attcccaaag 840

ggcttacgac tcacaggttg agagccagcc actgccttaa agtcgtctag aatcagtttt 900

ctttcttttt tgacagacaa gatgtttaat tccgttgtag tgaaggaaag ccattttatg 960

tatttttctt aagtgcctta tcagtaatga caattctgaa agcccctgtg ttatatttta 1020

acaacacagt cacctccggt tctgtattca ctgtccgtgt tgtgactccc acagtataaa 1080

ttcctccagt tgatcttcat gaattcttat atttgatccc cccccctt aggcctctga 1140

attccgagtg agtccgagtt aaaaatggga ggagcaccct ctagctgata aacctgggta 1200

atgaggtgtc cgctttcagt ttccattctg tacgcgacta tactgcttgt gtgagcccta 1260

acagacagaa tcagctcaga acaaagggtc tggctatctc ccagggatga acacgcacgc 1320

cgactgagct tttgggggtg tgaaaagtca acgccttcgc acagaactct ccacccaac 1380

ctagaaataa ctggcgttct gttttatgtc agtccggaca cgcaagcact gtccttttg 1440

cgggccccgt aagcatcccc ccaggcggga tagggatccc cggcctatgg actgcgcttt 1500

ctcagctggc atccagctgc cttagcaccc agtccggggc cactctgcct acagacccta 1560

gcaaccactc acctgctttt ctttcctat aggccagaaa ttttccttt cttttctcat 1620

tggtccgcgt aactttatcg caaccaatcg gcggtacacg ggaacaaact cactcctaca 1680

caacctgcgt tggggggagg taacctggga agacctatat ctgttttctg caccgctatt 1740
tttttccgag aagcaactaa cttcttaccg tgtcgtagct atccctggaa tgaggcgctt 1800
acacatttta tttctttcat gcctgacata aagtctggcc ctgtctcgct cctgcccccc 1860
gtccaaatgg ctcgggccgc ggaacgcca tcttccaggc acattgagag cggagtcctt 1920
ggagggagtt tagggtggtg attctacaac ggcgactagc aagtggcggg cttcagccct 1980
ttcccgctgc tctcctggtc gcgaccacac gtcacagctc tcgctcgctt cggttgctcg 2040
cgcaggggggt ggggagtggt gttaaccgga gcggctgccg cagtcgcggt gattgagcgt 2100
actccgcgc gccccgcgcc gccggaagtg aggtgtctta ccccggaagt tccggttcgc 2160
aggggggtggg gagtgttggt aaccggagcg gctgccgcag tcgcggtgat tgagcgtgct 2220
cgcggcgctg ggctcctggt gagtgggcct ggtcctgatt ggggttgggg ggtcggcgtc 2280
taggaccttg tcctttgggg tcactgcgat cagcccgccc cgctgcgttc ggccgccagt 2340
tttggcctg tcagatggct ggagacctta ggcggcggcg cggccaccgt tccagaggcc 2400
gggccccgcc tgcgaggctt gcaactccta gcgttcacag gtgcgcgact gtgaggcgac 2460
ctgactggtt ctcagccccg ccgccgcacc ctggcggtcg gccgtttctc cggttctcag 2520
agtggacact gctgggggcg gggggggggg cagggttcca gactgacgta ccccgatggg 2580
cgcggtctg cgctgaccac cctggcacag ctgtcactgg ttgtgtcgcc ttctcaagct 2640
gtgccctctg caccttgctt cctccacccc tggcggggccc agcgaacctg cctctaaagc 2700
ctatcatccc agctccttca gagggtcagc ggtggcagcc cccctcctcc taactttgcc 2760
tcagtgactc cctagaggag gcgccttggc agacagcgtg gaagagccct agatttgaaa 2820

cgagattgat ccaagttcta ggccttgcat cagtgtgagc ctctaacccc tttagatcct 2880
 agtttctcgt ttgtgaaaca gggagtatat gctgttttga atctaattggc tgtcaagggtg 2940
 aaatgagtgt ttgcccttac actctgccag ggactgtgct aggtttacat agtgtggata 3000
 tcacaaatgt cattttcctt gtgcaggtct ctgggccagg gcgatg 3046

<210> 2

<211> 3092

<212> DNA

<213> Homo sapiens

<400> 2

ttggctcata acctcacttc ctttaagtct ttgctcaaat gtcaccttct caaggaagct 60
 taccgatta tcctcgctga tactgcaacc agcttcaagt accccaccac atcctgatcc 120
 cctttattct gttctacttt tttcctatag cactgatcat cttccagcgt attagatttt 180
 tcacttatgt ctgtggtttg ctgtcacatc tactaggata agctccacaa aggtagagat 240
 ctttattttg ttactgaca tcctaagtcc ctagaacagg agacacttga tccatatttg 300
 tagactaact gaataaatga ctttaattacc agtttggatg tgggggcaga tagtgagcat 360
 gatgcccgtt tccggagctg ggggtgcagac agtgtctagg gacactgaac tgttttaaaa 420
 gcaggataga tcccggctgg agaccacaca aggaaatcat cagcacctgg gtcaggggct 480
 ggactggagc agaggaaatc atgcaggaaa agtaaagaga aggacatcag gtaaagagaa 540
 gaggacacat gcatagccag agagaaaaga ggagcagagg catgtggatc acagaagctt 600
 agggaggaga ctttcaagaa ggggagagag gttgagtcaa gcaagggctg aaagccaacc 660

attggatgca gtcactagaa agttacagat aggcaaggtg ttgtggctca cgcctgtaat 720
cccaacacct tgtggggctg aggtgggagg atcgcttgag cccgggaggt cgaggctgca 780
atgagccctg atggcgccaa tgcactccag cctgggcgac agagcaagac cctgtcgcaa 840
aaattaataa ataaataaat aaaaagaaaa gggggaaaaa aagttatacg tggccttacg 900
gggaagccaa ctctgactgg ttataagctg aaactgtcaa gtcaacaggt ggcagggaag 960
atggctgaga ccaacagcac agagatttag aggcagacag acctggcgcc aatcctagga 1020
caggttttgg taagcctttg aatttcaatt gccccacgtt tcgggggagg gggtagcacc 1080
ccctagctca taaaccttag tgattgatga tttaatgaga tgacggagga aaacgcaagg 1140
cacaagtgg atgcattagc tccattttgt taatcagcag gcttagttgg ctgcgaccca 1200
gacacgaact aaaatacagt gcagcccagg accagtgggg gtcttgctta tggetcagag 1260
ctgaacaaca catgggcagc aaaatcagac actgagatgc gggcaggcct gcgacgtga 1320
agtcaattcc tttgaacaaa cagaacactt ccgtcccaag attagcagga attaattctc 1380
cagtctcggg tacacctggt tgtccctccc tgtcctggcg cggcaaactg tcccggaggc 1440
cagccaggga tcactcgccc aaggactgag ctttccctac tctcagccaa ctggagcggg 1500
accagggcct aggcaacgca gctgtccgcc cctaacaacc actcacctgc tttccccttt 1560
ctataggcca gcaaaggtag attctttttc ttattgggcc gcgtaactta tcgcaaccaa 1620
tcagtggcag ccacgggacc caactcactc ccacacaact tgtgggggtg atcatggaga 1680
agacaaattt ttgttttccg catccagttc tctcagagag caccgtattt gtcaaactgt 1740
tgtgactctc cctaaatggt taagaaaaca tttcattccc ctcaggcttg tatagtctgt 1800

ccctggccta ctccccgctc caggtgggtac agccccgaag cggctcccct tcccagctgc 1860
tcgcggggcc gaggccccca gtccgaggag gccactcagc gcaggagcca taccatctgt 1920
gactaataaa taataggggg acctccgact cccccctgtt gccttattac cttccgacca 1980
cctctcggac ctcttgccca gcccttcccc gtagacatca ccccagatac ggtgggtgaca 2040
ccattgctat gggcccacgt agggcgagcgt gcgagccagg gcaggacgca cttgggtacga 2100
cccacgccgc gccccgcgcc gccggaagtg aggtgtctga cccccgaagt tccggttcgc 2160
aggggggtggg gagggttgtt aaccggaggg gcagccgcag tcgcgcggat tgagcgggct 2220
cgcggcgctg ggttccttgt gaggggggcg aagtctggcc cgagttgttg ttggggtcgg 2280
gaccogaacc tttcccttga ggtctccgga gtccgcacgc ccctcagccc cgccgcacgc 2340
tttcggcctg tcagctggcc ggagacctca gacgccgtg cgcccgcttt gctcaagcct 2400
gggccctgcc tgcgacgcc gcaactcctg gtgctcacag gtgcgcggcc gcgaggcgca 2460
cccggctcct ccgctccgc tgctgtcttc tccgctcccg ctgtttttgt ggtgctctga 2520
gttgacacta ctccgggggt cgggggaccc caggattcca ggctgacgtt ccccgccgc 2580
tccgcaggg cgggcgccg aactgcccac cctaacacag ctgtcaccgg cgctgtcgcc 2640
tgcccagcct gctatcctct gtgccttggc tgctctcagc cctggctgcg cattcccgc 2700
cctggagcag atttctgtg ttgcctccca cccatcttc tccaccggag ggtcagcgt 2760
gcagctcccc ctctccaac attgcagctt ttctcatca cctccctaga ggaggcggct 2820
tggcaggcag cgtggaaaga gccctagatt tgaagcaaga ctgaccagg ttccaggcct 2880
tgcgctcagt tgatcactta accccttoga gtctaatttg taaaatgggg tagcgtaagc 2940

tattctttgt ctgatgattt cgagggcgaa atgtgatttc cccccactt tctcctatga 3000
attgaggctg tgccaggcac cgggctatct tgcacagcac gagcatcaca taagttattt 3060
tcttgcccca tgcaggtctc cgggccaggg ca 3092

<210> 3
<211> 19
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 3
gcgccgccgt aagtgaggt 19

<210> 4
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 4
aagtgagttg tcttaccccc 20

<210> 5
<211> 20
<212> DNA
<213> Artificial

<220>
<223> synthetic DNA

<400> 5

actccgccaa gccccgcgcc

20

<210> 6

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 6

gcgccgccgg aagtga

16

<210> 7

<211> 16

<212> DNA

<213> Artificial

<220>

<223> synthetic DNA

<400> 7

gcgccgccgt aagtga

16

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/012424

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

Int.Cl⁷ C12N15/12, C12N5/10, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, A61K35/76, A61K48/00, A61P29/00

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

Int.Cl⁷ C12N15/12, C12N5/10, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, A61K35/76, A61K48/00, A61P29/00

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

JSTPlus (JOIS), SwissProt/PIR/GeneSeq, Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq, BIOSIS/WPI (DIALOG)

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
<u>X</u> Y	WO 02/052007 A1 (LOCOMOGENE, INC.), 04 July, 2002 (04.07.02), Seq. 1-2 & EP 1352961 A1	<u>1-10</u> 11-12
Y	Kamura T. et al., Characterization of the human thrombopoietin gene promoter. A possible role of an Ets transcription factor, E4TF1/GABP, J.Biol.Chem., 1997, Vol.272, No.17, pages 11361-8	11-12
Y	Ouyang L. et al., GABP mediates insulin- increased prolactin gene transcription, J.Biol.Chem., 1996, Vol.271, No.18, pages 10425-8	11-12

☒ Further documents are listed in the continuation of Box C.

☐ See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p>	
<p>"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p>	<p>"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p>
<p>"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date</p>	<p>"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p>
<p>"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p>	<p>"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p>
<p>"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p>	<p>"&" document member of the same patent family</p>
<p>"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	

Date of the actual completion of the international search
15 September, 2004 (15.09.04)

Date of mailing of the international search report
05 October, 2004 (05.10.04)

Name and mailing address of the ISA/
Japanese Patent Office

Authorized officer

Facsimile No.

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/012424

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	Kaneko M. et al., Human HRD1 protects against ER stress-induced apoptosis through ER-associated degradation, FEBS Lett., 2002, Vol.532, No.1-2, pages 147-52	1-12

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/JP2004/012424

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.b of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application and necessary to the claimed invention, the international search was carried out on the basis of:

a. type of material



a sequence listing



table(s) related to the sequence listing

b. format of material



in written format



in computer readable form

c. time of filing/furnishing



contained in the international application as filed



filed together with the international application in computer readable form



furnished subsequently to this Authority for the purposes of search

2. ☒ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing and/or table relating thereto has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that in the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

A. 発明の属する分野の分類 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. ⁷ C12N15/12, C12N5/10, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, A61K35/76, A61K48/00, A61P29/00

B. 調査を行った分野

調査を行った最小限資料 (国際特許分類 (IPC))

Int. Cl. ⁷ C12N15/12, C12N5/10, C12N1/15, C12N1/19, C12N1/21, A61K35/76, A61K48/00, A61P29/00

最小限資料以外の資料で調査を行った分野に含まれるもの

国際調査で使用した電子データベース (データベースの名称、調査に使用した用語)

JSTPlus(JOIS) SwissProt/PIR/GeneSeq Genbank/EMBL/DDBJ/GeneSeq BIOSIS/WPI(DIALOG)

C. 関連すると認められる文献

引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
<u>X</u> Y	WO 02/052007 A1 (株式会社ロコモジェン) 2002.07.04, seq.1-2 & EP 1352961 A1	<u>1-10</u> 11-12
Y	Kamura T. et al., Characterization of the human thrombopoietin gene promoter. A possible role of an Ets transcription factor, E4TF1/GABP, J. Biol. Chem., 1997, Vol.272, No.17, pages 11361-8	11-12

☒ C欄の続きにも文献が列挙されている。☐ パテントファミリーに関する別紙を参照。

* 引用文献のカテゴリー

- 「A」特に関連のある文献ではなく、一般的技術水準を示すもの
「E」国際出願日前の出願または特許であるが、国際出願日以後に公表されたもの
「L」優先権主張に疑義を提起する文献又は他の文献の発行日若しくは他の特別な理由を確立するために引用する文献 (理由を付す)
「O」口頭による開示、使用、展示等に言及する文献
「P」国際出願日前で、かつ優先権の主張の基礎となる出願

の日の後に公表された文献

- 「T」国際出願日又は優先日後に公表された文献であって出願と矛盾するものではなく、発明の原理又は理論の理解のために引用するもの
「X」特に関連のある文献であって、当該文献のみで発明の新規性又は進歩性がないと考えられるもの
「Y」特に関連のある文献であって、当該文献と他の1以上の文献との、当業者にとって自明である組合せによって進歩性がないと考えられるもの
「&」同一パテントファミリー文献

国際調査を完了した日

15.09.2004

国際調査報告の発送日

05.10.2004

国際調査機関の名称及びあて先

日本国特許庁 (ISA/J P)

郵便番号100-8915

東京都千代田区霞が関三丁目4番3号

特許庁審査官 (権限のある職員)

鈴木 恵理子

4 N

3 1 2 6

電話番号 03-3581-1101 内線 3448

C (続き): 関連すると認められる文献		
引用文献の カテゴリー*	引用文献名 及び一部の箇所が関連するときは、その関連する箇所の表示	関連する 請求の範囲の番号
Y	Ouyang L. et al., GABP mediates insulin-increased prolactin gene transcription, J. Biol. Chem., 1996, Vol.271, No.18, pages 10425-8	11-12
A	Kaneko M. et al., Human HRD1 protects against ER stress-induced apoptosis through ER-associated degradation, FEBS Lett., 2002, Vol.532, No.1-2, pages 147-52	1-12

第 I 欄 スクレオチド又はアミノ酸配列 (第 1 ページの 1. b の続き)

1. この国際出願で開示されかつ請求の範囲に係る発明に必要なスクレオチド又はアミノ酸配列に関して、以下に基づき国際調査を行った。

a. タイプ ☒ 配列表

☐ 配列表に関連するテーブル

b. フォーマット ☐ 書面

☒ コンピュータ読み取り可能な形式

c. 提出時期 ☐ 出願時の国際出願に含まれる

☒ この国際出願と共にコンピュータ読み取り可能な形式により提出された

☐ 出願後に、調査のために、この国際調査機関に提出された

2. ☒ さらに、配列表又は配列表に関連するテーブルを提出した場合に、出願後に提出した配列若しくは追加して提出した配列が出願時に提出した配列と同一である旨、又は、出願時の開示を超える事項を含まない旨の陳述書の提出があった。

3. 補足意見：

**This Page is Inserted by IFW Indexing and Scanning
Operations and is not part of the Official Record**

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images include but are not limited to the items checked:

- ☐ BLACK BORDERS
- ☐ IMAGE CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- ☐ FADED TEXT OR DRAWING
- ☐ BLURRED OR ILLEGIBLE TEXT OR DRAWING
- ☐ SKEWED/SLANTED IMAGES
- ☐ COLOR OR BLACK AND WHITE PHOTOGRAPHS
- ☐ GRAY SCALE DOCUMENTS
- ☒ LINES OR MARKS ON ORIGINAL DOCUMENT
- ☐ REFERENCE(S) OR EXHIBIT(S) SUBMITTED ARE POOR QUALITY
- ☐ OTHER: _____

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

As rescanning these documents will not correct the image problems checked, please do not report these problems to the IFW Image Problem Mailbox.